Postverlagsort Berlin

ZEITSCHRIFT FÜR ZELLFORSCHUNG UND MIKROSKOPISCHE ANATOMIE

HERAUSGEGEBEN UND REDIGIERT VON

W. BARGMANN
KIEL

B. SCHARRER
NEW YORK

J. SEILER
ZÜRICH

54. BAND, 5. HEFT

MIT 78 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 28. JULI 1961)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1961

Z. Zellforsch.

Preis DM 47.60

Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie

Begründet 1924 unter dem Titel: Zeitschrift für Zellen- und Gewebelehre. Redigiert von *R. Goldschmidt* und *W. von Möllendorf*. Bd. 2—28 (1938). Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie. (Bd. 1—20), 1934 als: Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie Abteilung B) herausgegeben von *R. Goldschmidt, W. von Möllendorff, H. Bauer, J. Seiler*. Bd. 29—33 (1944) Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie Abteilung A. Allgemeine Zellforschung und mikroskopische Anatomie. Herausgegeben und redigiert von *W. von Möllendorff* und *J. Seiler*, Berlin, Springer. Bd. 34—35 (1948—1950) Springer, Wien, ab Bd. 36 Springer, Berlin, ab Bd. 34 ohne den Untertitel Abteilung A_1 Allgemeine Zellforschung usw.

Ab Bd. 2 (1925) mit dem Untertitel: Fortsetzung des Schultze-Waldeyer-Hertwigschen Archivs für mikroskopische Anatomie. [Dieses wurde begründet 1864. Bd. 1—13 (1876) herausgegeben von *Max Schultze*; Bd. 13, Heft 4, bis Bd. 35 (1890) herausgegeben von *v. La Valette St. George, W. Waldeyer*; Bd. 36—43 (1894) herausgegeben von *O. Hertwig, v. La Valette St. George, W. Waldeyer*. Ab Bd. 44 als Archiv f. mikroskopische Anatomie und Entwicklungsgeschichte, ab Bd. 77—95 (1910—1922) in 2 Abteilungen. Bd. 1—95, Bonn, Cohen. Ab Bd. 96 Berlin, Springer. Fortsetzung Bd. 98—104 (1923—1925) Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik. Herausgegeben von *W. Roux, H. Braus, H. Spemann*.]

Die Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie steht Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der beschreibenden und experimentellen Zellen- und Gewebelehre sowie dem Gebiet der mikroskopischen Anatomie des Menschen und der Tiere offen, wobei Arbeiten mit funktionellem und experimentellem Inhalt bevorzugt werden.

Arbeiten karyologischen Inhalts werden an die Zeitschrift „Chromosoma", Arbeiten zur histochemischen und histophysikalischen Grundlagenforschung, insbesondere ihrer Methodik, an die Abteilung „Histochemie" weitergeleitet.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Alle Manuskripte sind zu senden und Anfragen zu richten an:

Prof. Dr. W. Bargmann, Kiel, Anatomisches Institut der Universität, Neue Universität, Eingang F 1,

Prof. Dr. Berta Scharrer, Albert Einstein College of Medicine, Dept. of Anatomy, Eastchester Road and Morris Park Avenue, New York 61, N.Y., USA,

Prof. Dr. J. Seiler, Zürich 6, Sonneggstr. 45.

Springer-Verlag

Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3, Fernsprecher 830301, Fernschreibnummer 01-83319
Heidelberg 1, Postfach 3027, Fernsprecher 27901, Fernschreibnummer 04-61723

54. Band **Inhaltsverzeichnis** 5. Heft

Seite

Oksche, A., Vergleichende Untersuchungen über die sekretorische Aktivität des Subkommissuralorgans und den Gliacharakter seiner Zellen. Mit 26 Textabbildungen . . 549

Nishitsutsuji-Uwo, J., Electron microscopic studies on the neurosecretory system in Lepidoptera. With 12 Figures in the Text 613

Wittekind, D., Über das Verhalten von lebenden Blut- und Exsudatzellen in hochprozentigen, isotonischen Eiweißlösungen. Mit 12 Textabbildungen 631

Trujillo-Cenóz, O., Electron microscope observations on chemo- and mechano-receptor cells of fishes. With 22 Figures in the Text 654

Merker, H.-J., Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Bildung der *Zona pellucida* in den Follikeln des Kaninchenovars. Mit 6 Textabbildungen 677

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Zeitschrift für Zellforschung 54, 549—612 (1961)

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Marburg a. d. Lahn
(Direktor: Prof. Dr. K. Niessing)

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE SEKRETORISCHE AKTIVITÄT DES SUBKOMMISSURALORGANS UND DEN GLIACHARAKTER SEINER ZELLEN *

Von

A. Oksche

Mit 26 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Januar 1961)

Inhalt

Seite

Einleitung und Fragestellung 550
Material und Methodik 553
Befunde 554
I. Amphibia, Anura 554
a) *Rana temporaria* L. *(Rana fusca* Roesel*)* 556
b) *Hyla arborea* L. und *Bufo bufo* L. 568
II. Cyclostomata 569
a) *Petromyzon planeri, Ammocoetes* 569
b) *Petromyzon fluviatilis* L. *(adult, 365 mm Länge)* 570
III. Elasmobranchii, Selachii 571
Halaelurus chilensis (Guichenot) 571
IV. Reptilia, Lacertilia 573
Chalcides ocellatus Forsk. 573
V. Aves 576
a) *Gallus gallus* 576
b) *Zonotrichia leucophrys gambelii (Passeriformes)* 578
VI. Mammalia 579
1. Insectivora 579
Erinaceus europaeus L. 579
2. Carnivora 580
a) *Felis domestica* 580
b) *Canis familiaris* 584
3. Ungulata 588
Bos taurus 588
4. Rodentia 590
a) *Mus musculus* 590
b) *Cavia cobaya* 592

* Für Unterstützung habe ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Marburger Universitätsbund, sowie Herrn Prof. Dr. K. Niessing und Herrn Prof. Dr. G. Petry, Marburg, zu danken. Ein Studienaufenthalt in den USA wurde mir vom Deutschen Akademischen Austauschdienst, Prof. Dr. E. Scharrer, Albert Einstein College of Medicine, New York, N. Y. und Prof. Dr. D. S. Farner, Washington State University, Pullman, Washington, ermöglicht.

Für technische Hilfe gebührt Dank Herrn cand. med. F. Wolff und Herrn cand. med. E. Börner, für Photoarbeiten Herrn E. Fraedrich, Frl. E. Hauberg und Frl. G. Mahler. Wertvolles Hirnmaterial habe ich erhalten von Dr. N. Badir, Kairo, Prof. Dr. D. S. Farner, Pullman, Wash. (mit Unterstützung der National Science Foundation und der National Institutes of Health), Prof. Dr. J. W. Harms, Marburg, Prof. Dr. H. Hofer, Gießen, Prof. Dr. H. Huber, Marburg, Prof. Dr. J. Kezer, Eugene, Oregon, Dr. W. Kloene, Marburg (Behringwerke) und Dr. E. S. G. Schmidt, Buenos Aires.

Seite
5. Primates 592
Macaca 592
6. Homo 594
VII. Vergleichend-anatomische Analyse und Deutung der Strukturen des Wirbeltier-Subkommissuralorgans 601
a) Das Subkommissuralorgan als polar differenziertes sekretorisches Organ . 601
b) Ependymaler und hypendymaler Zellverband des Subkommissuralorgans . 604
c) Gliacharakter des sekretorischen Parenchyms im Subkommissuralorgan . 605
d) Progressive und regressive Entwicklung des Wirbeltier-Subkommissuralorgans 605
Zusammenfassung 607
Literatur 608

Einleitung und Fragestellung

Als Subkommissuralorgan (SKO) bezeichnet man seit Dendy und Nicholls (1910) einen Bezirk besonders differenzierter hoher Ependymzellen, die im Grenzgebiet des Zwischen- und Mittelhirns das Dach des 3. Ventrikels bekleiden (s. Abb. 1, 4, 5). Das meist mehrreihige SKO erstreckt sich vom kaudalen Ende der Epiphyse bis zum Anfangsteil des Aquaeductus mesencephali. Nach älteren Untersuchungen soll es eine allgemein vorhandene Differenzierung des Wirbeltiergehirns darstellen und nur bei Igel, *Sorex*, *Crossopus*, Delphin, sowie auch beim erwachsenen Menschen fehlen (ausführliche Literatur bei Bargmann 1943, Clara 1953, Olsson 1958a, b, Talanti 1958). Dieser Anschauung schließen sich auch die Untersucher der letzten Zeit an, die sich neuer, verbesserter histologischer Methoden bedienten (Mazzi 1952, Wingstrand 1953, Oksche 1954, 1956, 1959/60, 1960, Hofer 1958, Olsson 1958, Talanti 1958).

Nachdem man schon früher eine sekretorische Aktivität des SKO vermutet hatte, gelang es erstmalig Stutinsky (1950), das Sekret des SKO mit Chromalaunhämatoxylin elektiv anzufärben. Diese Methode war vorher von Bargmann (1949) mit großem Erfolg zur Darstellung der hypothalamischen Neurosekretion angewandt worden. Auf die Mitteilung Stutinskys folgten eingehende Studien von Mazzi (1952), Bargmann und Schiebler (1952), Wislocki und Leduc (1952). Dawson (1953) zeigte, daß noch ein zweites Färbeverfahren — die Paraldehydfuchsin-Methode (Gomori-Halmi) — zur Darstellung des subkommissuralen Sekretes vorzüglich geeignet ist. Diese Färbung wird auch in der Modifikation von Gabe angewandt (Hofer 1958).

Wislocki und Leduc (1952) wiesen im SKO der Ratte eine beachtliche Zellaktivität nach, die durch den positiven Ausfall verschiedener histochemischer Fermentreaktionen gekennzeichnet war, insbesondere durch den Nachweis saurer Phosphatase (vgl. Talanti 1958, 1959). Das Sekret des SKO ist ein Mucoproteid bzw. Glykoproteid oder ein Mucopolysaccharid-Eiweiß-Komplex (Bargmann und Schiebler 1952, Mazzi 1952, 1954, Wingstrand 1953, Oksche 1954, Olsson 1958, Talanti 1958). Weitere Untersuchungen am SKO wurden durchgeführt von Enami (1954), Okada (1955), Arvy u. a. (1955), Gilbert (1956, 1957, 1958), Grignon (1956), Adam (1957), Fleischhauer (1957), Murakami u. a. (1957), Bosque u. a. (1958), Hofer (1958), Fridberg und Olsson (1959), Holmgren (1959), Talanti und Kivalo (1960), Landau (1960). Im embryonalen menschlichen SKO wurde der erste elektive Sekretnachweis durch Oksche (1956) erbracht; dieser Befund wird durch die Ergebnisse von Wislocki und Roth (1958) bestätigt.

Einige Untersucher widmeten ihre besondere Aufmerksamkeit dem Zusammenhang der Aktivität des SKO mit der Bildung des *Reissnerschen Fadens* (Abb. 5, 8b), der am SKO entspringt und bis in den Zentralkanal des Rückenmarks hinein verfolgt werden kann (vgl. Agduhr 1932, Bargmann 1943). In diesem Zusammenhang sind ganz besonders die Arbeiten Olssons (1955, 1956, 1957, 1958a, b) zu nennen. Olsson zeigt, daß der Reissnersche Faden durch die Tätigkeit des SKO entsteht und daß die Fadenstruktur als geronnenes Sekret des SKO aufzufassen ist. Das Problem des Reissnerschen Fadens wird ausführlich von Olsson (1958a, b), sowie Hofer (1959) erörtert.

Zu definieren ist noch das dem Ependymverband des SKO eng benachbarte *Hypendym*. Krabbe (1925, s. auch 1953) konnte bei Säugern zwischen dem ependymalen Zellverband des SKO und der Comm. post. diffus verteilte Zellen beobachten, die in einem lockeren Faserwerk eingebettet waren. Er bezeichnete diese Zellformation als das *Hypendym*. Beim Rind tritt die hypendymale Zellformation des SKO erstmalig bei 100 mm langen Embryonen in Erscheinung (Turkewitsch 1936). Turkewitsch sah in ihr eine dem „Epiphysenhinterlappen" analoge Bildung. Dagegen fassen Bargmann und Schiebler (1952), Wislocki und Leduc (1952, 1954) sowie Talanti (1958) die Hypendymzellen als Gliazellen auf, die ähnlich wie das subkommissurale Ependym Körnchen enthalten können, die sich mit Chromalaunhämatoxylin elektiv färben. Wislocki und Leduc (1954) dachten hier an Mikroglia-Zellen. Olsson (1958a, b) wies dagegen auf Grund seiner Untersuchungen am SKO des Rindes darauf hin, daß die Hypendymzellen Abkömmlinge des Ependyms sind. (Besser als durch eine umständliche Beschreibung wird die von Art zu Art sehr unterschiedliche Lage, Verteilung und Differenzierung des subkommissuralen Hypendyms durch die Abb. 26 veranschaulicht.) Das Vorkommen von Sekretkörnchen in den Hypendymzellen und deren sehr enge Gefäßbeziehungen (Oksche 1956, 1959/60, Talanti 1958) machen es notwendig, die Herkunft und Bedeutung dieser Zellen an einem umfassenden, nach phylogenetischen und ontogenetischen Gesichtspunkten zusammengetragenen Material zu analysieren, wobei man von den Verhältnissen bei niederen Wirbeltieren ausgehen muß.

Am SKO sind die folgenden Aufgaben wesentlich:

1. Durch embryologische und neurohistologische Studien ist zu prüfen, ob die sekretorischen ependymalen und hypendymalen Zellen des SKO zur Formenreihe der Glia gehören und eine funktionelle Leistungsgemeinschaft bilden.

2. Die Sekretbildung ist eingehend mit der histochemischen und elektronenmikroskopischen Methodik zu erforschen.

3. Die Wege der Sekretabsonderung sind genau festzustellen.

4. Es müssen konkrete Beiträge zum Funktionsproblem der SKO geliefert werden.

In Hinsicht auf die Wege der Sekretabgabe muß ich auf die Anschauungen Olssons (1958a, b) eingehen. Olsson sieht die primäre, phylogenetisch alte Funktion des SKO nur in der Bildung des *Reissnerschen Fadens* (Abb. 5), der durch Sekretabsonderung an der freien Ventrikeloberfläche entsteht. Ich konnte aber durch Untersuchungen beim Grasfrosch (Oksche 1954, 1955, 1956, 1957, 1959/60) feststellen, daß die bis zur äußeren Grenzmembran

aufsteigenden ependymalen Zellausläufer des SKO, die über enge Gefäßkontakte verfügen, nicht selten wesentlich mehr Sekret enthalten als der der freien Ventrikeloberfläche zugekehrte Zellpol. Daraus folgerte ich, daß das polar differenzierte SKO sein Sekret sowohl in den Ventrikel als auch an die Blutgefäße abgibt. Sekretstraßen konnten bis zur Membrana limitans externa verfolgt werden, wo eine enge räumliche Beziehung zu den flüssigkeitsgefüllten Räumen der weichen Hirnhaut bestand. Dieser Befund wird bestätigt durch die Ergebnisse von Okada (1955) bei *Bufo* und Murakami, Ban und Aiura (1957) bei *Gecko japonicus*; auch hier wurden Sekretstraßen des SKO bis zu den Blutgefäßen und bis zum Subarachnoidalraum beobachtet. Olsson fand zwar Sekretkörnchen auch an dem ventrikelfernen Pol des Zellkerns, deutete diese Erscheinung aber nur als Ausdruck einer vorübergehenden Stapelung oder Rückstauung. "No accumulation of granules in the ependymal feet or other indication of a peripheral release has, however, been found" (Olsson 1958a, S. 88). Eine Sekretabgabe an die Blutgefäße erscheint Olsson (1958b, S. 10) nur bei Säugern glaubhaft, wenn es auch dort an Beweisen mangelt. Talanti (1958, 1959) konnte dagegen bei verschiedenen Haustieren (Rind, Pferd, Schwein, Hund) sekrethaltige Ependymzellfortsätze des SKO beobachten, die an Gefäßen ausliefen (vgl. auch Talanti und Kivalo 1960). Talanti hält eine Sekretabgabe an die Gefäße auch bei Säugern für wahrscheinlich. Die Frage nach den Beziehungen des Sekretes zu den Blutgefäßen ist so wichtig, daß sie ausführlich bearbeitet werden muß.

Unsere Bemühungen zur Klärung der Funktion des SKO werden von der Annahme ausgehen, daß das SKO eine im ZNS gelegene Drüse (Abb. 2) darstellt (Wingstrand 1953, Oksche 1956, Olsson 1958a, b, Talanti 1958, Hofer 1958). In diesem Zusammenhang wird ein Vergleich der sekretorischen Aktivität des SKO mit den besser erforschten und aufgeklärten Phänomenen der Neurosekretion (vgl. E. und B. Scharrer 1954a, b, Bargmann 1954) durchzuführen sein. Durch die Ergebnisse der neuesten Untersuchungen ist mancher früheren Hypothese über die Funktion des SKO als Sinnesorgan (Dendy und Nicholls 1910, Dendy 1907, Marburg 1922) oder als Resorptionsfläche für hypophysäre oder hypothalamische Stoffe (Legait 1942, Stutinsky 1953) der Boden entzogen (vgl. ausführliche Zusammenstellung der älteren Literatur bei Bargmann 1943, Olsson 1958, Talanti 1958). Die Funktion des SKO ist in einer für alle Wirbeltiere gültigen Weise noch völlig ungeklärt. Sogar bei den Formen, für die experimentelle Ergebnisse vorliegen (Legait 1942, 1946, 1949, Wingstrand 1953, Oksche 1956, 1959/60, Gilbert 1956, 1957, 1958, Fridberg und Olsson 1959) ist es noch nicht möglich, die Funktion klar zu erkennen. Weitere experimentelle Arbeiten sind dringend notwendig. Durch den Liquorstrom ist das SKO auch mit den anderen „circumventrikulären Organen" (Bargmann, vgl. Hofer 1958) verbunden, von denen die Epiphyse, die Area postrema und das Subfornikalorgan genannt werden müssen. Mit der Epiphyse scheint das SKO einiger Wirbeltiere auch noch Gefäßbeziehungen zu haben (Oksche 1956, vgl. aber J. Ariëns Kappers 1960), die bei einigen niederen Formen (einer Reihe von Anuren) ein enger Kontakt des sezernierenden Subkommissuralparenchyms mit Nervenfasern, die von den Ganglienzellen der Epiphyse stammen, ergänzt (Dendy 1907, Oksche 1955, 1956, vgl. U. Holmgren 1959).

Durch das Gesagte sollte auf die biologischen Zusammenhänge hingewiesen werden, die in dieser Untersuchung nicht übersehen werden dürfen. Ihr Hauptziel bleibt jedoch, die *Cytodynamik sekretorischer Gliazellen* zu analysieren. Im SKO haben wir ein für diesen Zweck besonders günstiges Modell. Erst nach der Analyse der Aktivität des SKO scheint es ratsam, auf andere, noch rätselhafte Sekretionserscheinungen an gliösen Elementen einzugehen.

Durch die Erörterung solcher Fragen unterscheidet sich diese Studie von den anderen am SKO durchgeführten morphologischen Analysen. Unter dem Eindruck von Ergebnissen der histochemischen Methodik wurde nicht selten den vom SKO gebildeten Stoffen wesentlich mehr Aufmerksamkeit zugewandt als den sie produzierenden Zellen. Die Aktivität dieser Elemente kann erst dann erfaßt werden, wenn man aus der Entwicklung die sekretorische Potenz des ependymalen Mutterbodens kennt, aus dem das SKO hervorgeht und zum Vergleich auch die sekretorische Leistung der anderen Abkömmlinge dieser Matrix (z. B. Plexus chorioideus) begutachtet Es soll versucht werden, die sezernierenden Gliazellen nicht als einen isolierten Sonderfall zu betrachten, sondern die morphologische Organisation und Cytodynamik des SKO zur Beschaffenheit (Dicke und Differenzierung) der ganzen zugeordneten Ventrikelwand in Beziehung zu setzen. Der Zustand der Ventrikelwand ist wiederum nur aus dem Bau des ganzen ZNS verständlich. Dadurch ist die enge Beziehung zum Bauplan des ganzen nervösen Zentralorgans hergestellt, die für Überlegungen und Folgerungen funktioneller Art erforderlich ist.

Material und Methodik

Material. Untersucht wurden 344 lückenlose Serien des Subkommissuralorgans der Vertreter von 60 verschiedenen Wirbeltierarten, einschließlich des Menschen:

Cyclostomata. Petromyzon fluviatilis L. (2), *Petromyzon planeri* (Bloch) (4), *Ammocoetes* 25 mm, 32 mm, 38 mm, 130 mm.

Elasmobranchii, Selachii. Halaelurus chilensis (Guichenot) (1).

Ganoidei. Acipenser (spec.) (1), *Amia calva* L. (1).

Teleostei. Ameiurus (1), *Lebistes reticulatus* Peters (4), *Sicyases sanguineus* (4), *Clupea harengus* L. (1), *Phoxinus laevis* Ag. (2).

Amphibia, Urodela. Salamandra salamandra L. (1), *Salamandra atra* Laur. (1), *Triturus vulgaris* L. (3), *Triturus alpestris* Laur. (3), *Necturus maculosus beyeri* (1), *Eurycea longicauda melanopleura* (1), *Eurycea lucifuga rafinesque* (1), *Batrachoseps wrighti* (1), *Ensatina eschscholtzii oregonensis* (1), *Ensatina eschscholtzii picta* (1), *Plethodon dunni* (1), *Aneides ferreus* (1), *Typhlotriton spelaeus* (2), *Ambystoma macrodactylum* (1), *Taricha granulosa* (2).

Amphibia, Anura. Xenopus laevis Daud. (18), darunter Larven, Kaulquappen, Metamorphosestadien, Jungtiere, *Rana temporaria* L. (*Rana fusca* Roesel) (119), darunter 37 verschiedene Entwicklungsstadien, *Rana esculenta* L. (23), *Rana catesbeiana* (2), *Rana pipiens* (1), *Rana clamitans* (1), *Rana pretiosa* (2), *Hyla arborea* L. (6), *Bombina variegata* L. (4), *Bufo bufo* Laur. (53), darunter Larven, Kaulquappen, Metamorphosestadien, *Calyptocephalus* (1), *Paludicola* (1).

Amphibia, Apoda. Ichthyophis glutinosus L. (1).

Reptilia. Anguis fragilis L. (1), *Scincus scincus* L. (2), *Chalcides ocellatus* Forsk. (12), darunter Embryonen von 23—77 mm Länge, *Lacerta agilis* L. (1), *Lacerta vivipara* Jacq. (1), *Acanthodactylus boskanus* (1), *Glauconia cairi* D. (1).

Aves. Gallus gallus L. (2), *Columba livia aberr. domestica* L. (2), *Zonotrichia leucophrys gambelii* (6), *Taeniopygia castanotis* (1).

Mammalia, Insectivora. Talpa europaea L. (1), *Erinaceus europaeus* L. (2).

Rodentia. Mus musculus (4), darunter 2 Embryonen (12 mm, 25 mm), *Rattus rattus* (4), *Oryctolagus cuniculus* L. (1), *Cavia cobaya* Margr. (3).

Carnivora. Canis familiaris L. (4), darunter ein etwa 14 Tage sowie 4 Wochen altes Tier, *Felis domestica* Briss. (4), darunter 1 Embryo (12 mm), 2 neugeborene Tiere (1 Tag und 3 Tage alt).

Ungulata. Bos taurus L. (2).

Primates. Macaca cynomolga (2).

Homo. Adult (3), Embryonen (13): 17—350 mm, darunter 4 operativ entfernte, lebenswarm konservierte von 75, 90, 130 und 135 mm Scheitel-Steiß-Länge.

Materialgewinnung. Die Tiere wurden, soweit möglich, in der freien Natur gefangen und sofort konserviert. In der Gefangenschaft wurden die natürlichen Umweltbedingungen weitgehend nachgeahmt. Über die Haltung der Amphibien s. Lieber (1954), Oksche (1958). Cyclostomen wurden in toto konserviert von der Biologischen Station Helgoland bezogen. Fische, Amphibien, Reptilien, Vögel, Insectivoren, Nager, neugeborene Hunde und Katzen wurden durch raschen Scherenschlag dekapitiert. Zwischen Ergreifen des Tieres und Dekapitierung verging nicht mehr als 1 min. Nach sofortiger Freilegung des Gehirns konnte die Fixierung in den meisten Fällen bereits 1—3 min nach der Tötung eingeleitet werden. Dieses setzt eine für jede Wirbeltierklasse im einzelnen ausgearbeitete Technik voraus. Nur in Ausnahmefällen ging hier der Dekapitierung eine oberflächliche Narkose voraus. Adulte Hunde und Katzen wurden in tiefer Chloralose-Äther- oder Äthernarkose, die Rinder auf dem Schlachthof, die Rhesusaffen durch Carotisschnitt nach Nackenschlag getötet. Im Verlauf von gynäkologischen Operationen (Uterusexstirpation, Ausräumung) gelang es, menschliche Embryonen noch lebenswarm zu konservieren.

Nur in einigen Fällen wurde älteres Expeditionsmaterial der vergleichend-anatomischen Sammlung des Marburger Anatomischen Institutes zur histologischen Untersuchung herangezogen. Es war unter anderem möglich das Sekret im SKO von Objekten nachzuweisen, die vor etwa 50 Jahren konserviert worden waren.

Histologische Methodik. *Fixierung:* Bouin, Kaliumbichromat-Formalin-Eisessig (Kaformacet, Ciaccio), Zenker, Helly, Orth, Susa, Flemming (stark), Champy, Gendre, Lison und Vokaer (0° C), Rossman (0° C), Formol-Alkohol, neutrales Formalin (4%, 10%), Formalin nach Baker.

Einbettung: über Cedernholzöl, Methylbenzoat-Benzol oder Chloroform in Paraffin.

Schnittdicke 5—10 μ. Damit an einem Objekt verschiedene histologische und histochemische Methoden angewandt werden konnten, wurden Auszugsserien hergestellt und auf 6—10 verschiedene Objektträger verteilt.

Färbungen: Chromalaunhämatoxylin-Phloxin (Gomori-Bargmann-Smith), Paraldehydfuchsin-Orange G-fast green (Gomori-Halmi-Dawson). Molybdänhämatoxylin (Held), Eisenhämatoxylin (Heidenhain) mit und ohne Gegenfärbung (Phloxin), 0,1%iges wäßriges Toluidinblau.

Versilberung nach Bodian, Goldsublimatmethode nach Cajal (Gefrierschnitte), sowie Gliafaserdarstellung nach Holzer (Material Prof. Niessing).

Darstellung der Mitochondrien mit Säurefuchsin nach Altmann, Kull und Cowdry, mit Eisenhämatoxylin nach Hirsch und Bretschneider.

Histochemische Verfahren. PAS-Reaktion (McManus und Cason 1950), modifiziertes Perjodsäure-Leukofuchsin-Verfahren (Reagens nach Graumann 1953), Glykogennachweis mit der Bleitetraacetatmethode (Shimizu und Kumamoto 1952) kombiniert mit dem Diastasetest (hochgereinigte Diastase Merck in Anwendung nach Pearse 1953), Millon-Reaktion (Leuchtenberger 1950), Astrablau-Methode (Goslar 1957), Sudanschwarz.

Sofern über eine Methode kein besonderer Literaturhinweis gegeben wird s. Romeis (1948) oder Pearse (1953).

Befunde

Die Darstellung der Befunde wird auf eine Reihe von Formen beschränkt, deren Subkommissuralorgan charakteristische Verhältnisse aufweist.

I. Amphibia, Anura

Alles Wesentliche über das Subkommissuralorgan kann am Beispiel der Anuren erörtert werden, deren Zentralnervensystem mir schon früher als Modell

für Fragen des Stoffaustausches zwischen Liquor und Gehirn gedient hat (Oksche 1956, 1957, 1958a).

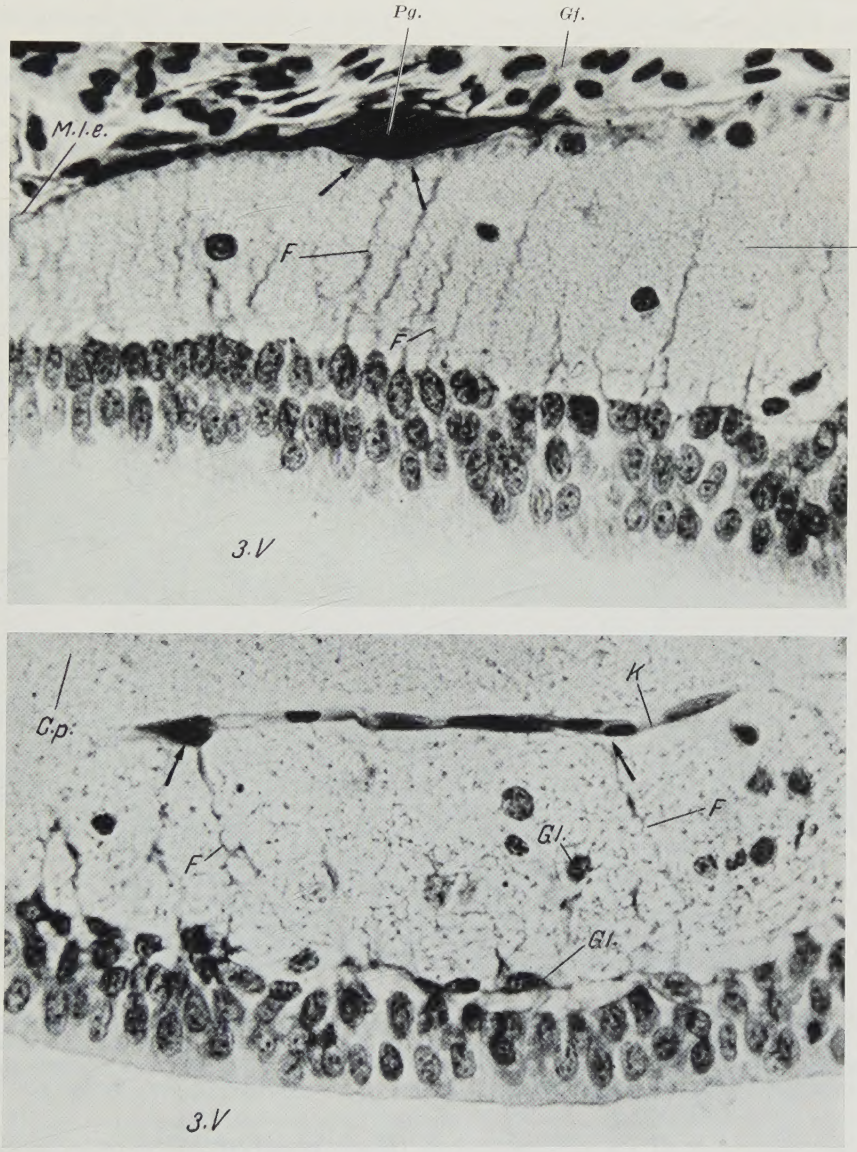


Abb. 1a u. b. Subkommissuralorgan (SKO) der Erdkröte *(Bufo bufo)*. Sagittalschnitt. Bouin fix., 0,1 %iges Toluidinblau. Vergr. 603fach. a Dünnwandiger rostraler Abschnitt. Ausläufer basaler Ependymzellen (*F*) durchsetzen die ganze Ventrikelwand und laufen mit einem Endfuß (↑) an der äußeren Grenzmembran (*M.l.e.*) aus. *3.V* 3. Ventrikel; *C.p.* Commissura posterior; *Pg.* Pigment; *Gf.* großes Gefäß in den primitiven Meningen. Die Wanddicke nimmt in rostro-kaudaler Richtung allmählich zu. b Kaudaler Abschnitt im Bereich des Kommissurenwulstes. (Objekt wie in Abb. 1a.) An der Basis des SKO sternförmige Gliazellen (*Gl.*). Die basalen Ependymfortsätze (*F*) erreichen hier nicht die äußere Grenzmembran; an den mit ↑ bezeichneten Stellen Gefäßbeziehungen mit einer Kapillare (*K*). *C.p.* Commissura posterior; *3.V* 3. Ventrikel

Das SKO der Anuren zeigt den einfachsten Bauplan (Abb. 1). Seine basale Zellreihe besteht aus typischen ependymalen Tanycyten, deren Zellfortsatz noch

bis zur äußeren Begrenzung der dorsalen Ventrikelwand reicht, um dort mit einem stempelartigen Endfuß auszulaufen. Horstmann (1954) hat die Bezeichnung Tanycyten für einen primitiven, aber sehr gut differenzierten Ependymtyp geprägt, der einen langen gestreckten Zellausläufer aufweist. Auf den besonders regen Zellstoffwechsel der Tanycyten wurde von Oksche (1958) hingewiesen.

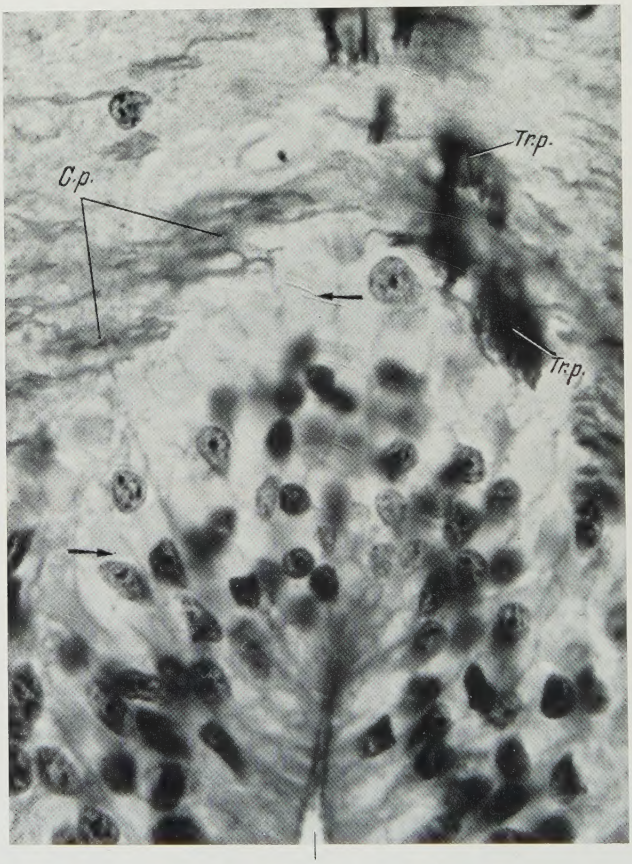


Abb. 2. Sekret im Subkommissuralorgan eines geschlechtsreifen Grasfrosches *(Rana temporaria)*. Frontalschnitt. Eisenhämatoxylin (Heidenhain), keine Gegenfärbung. Vergr. 500fach. *V*. Ventrikellichtung. In der basalen Reihe stark aufgetriebene helle Zellen (↑). Das Sekret ist hier nicht elektiv gefärbt, die Zellgrenzen sind deutlich zu erkennen. *C.p.* Comm. post.; *Tr.p.* Tractus pinealis

a) Rana temporaria L. (*Rana fusca* Roesel)

Das SKO des Grasfrosches ist sehr sekretreich (Abb. 2) und deshalb für die Analyse des Sekretionsrhythmus und der Sekretstoffe besonders geeignet. Aus diesem Grunde habe ich bei *Rana temporaria* ein lückenloses individualzyklisches Material von insgesamt 119 Objekten zusammengetragen. Harms (1924) hat ausdrücklich auf die Bedeutung des Individualzyklus als Grundlage für die Erforschung des biologischen Geschehens hingewiesen. Unter seiner Anleitung verfolgte Sklower (1925) den Individualzyklus des Grasfrosches und gewann dadurch wesentliche Einblicke in die Aktivität der Hypophyse, der Gonaden, der Schilddrüse und des Thymus. Gleichzeitig untersuchte Riech (1925) die Epithalamusregion, insbesondere die Epiphyse, ohne aber das SKO zu beachten. Auch Schubert (1957) geht bei der Abhandlung der Epiphyse im Individualzyklus von *Bufo bufo* auf das SKO

nicht ein. — Die Cytodynamik des Temporarien-SKO wurde in allen individuellen Variationen und Aktivitätsphasen zuverlässig erfaßt.

Der Individualzyklus des Grasfrosch-Subkommissuralorgans

Material. Die Entwicklungsstadien des Temporarien-Materials stammen aus der Umgebung Marburgs und aus dem Sauerland und wurden in zwei Sommern gesammelt. Zur Gewinnung der frühesten Entwicklungsphasen wurde eine Laichaufzucht auch in Aquarien und in einem Freilandbecken vorgenommen. Besondere Aufmerksamkeit galt der Meta-

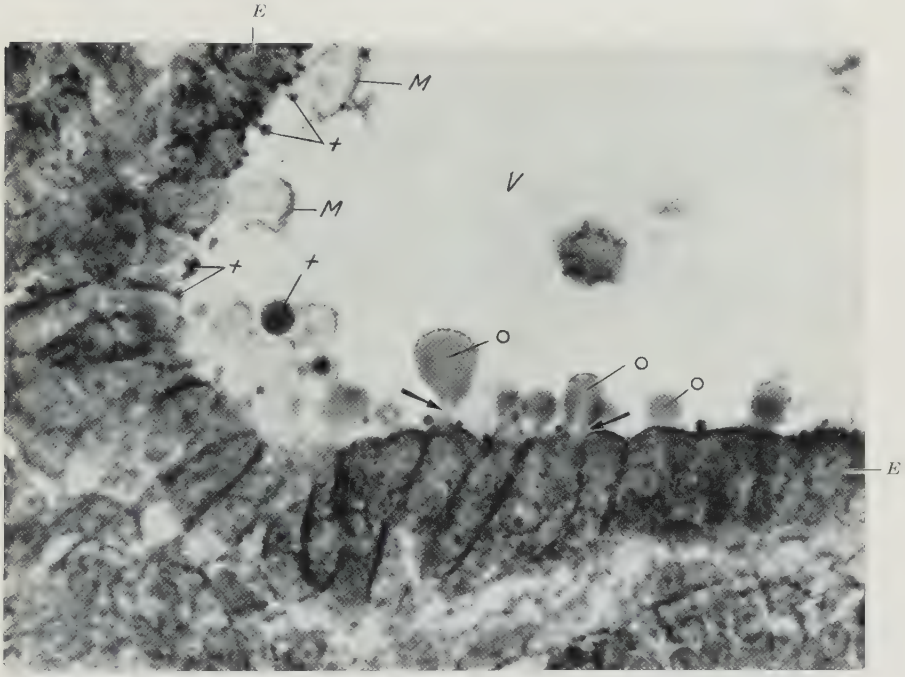


Abb. 3. Ependymsekretion in der Hirnanlage einer 3 mm langen Grasfroschlarve *(Rana temporaria)*. Sagittalschnitt. Bouin fix. Paraldehydfuchsin-fast green-Orange G. Vergr. 525fach. *E* Zellverband der ependymalen Matrix; *V* Ventrikellichtung; ↑ Abschnürung von Blasen aus dem apikalen Cytoplasma; ○ mit fast green gefärbte Blasen und Keulen; + mit Orange G gefärbte Kugeln und Körnchen; *M* mit fast green gefärbte gefaltete Membran, die geplatzte und ausgelaugte Blasen umgibt. In diesem Entwicklungsstadium des Froschhirns gibt es noch keine Plexus chorioidei

morphose. Die verschiedenen Metamorphosestadien konnten ohne Ausnahme in der freien Natur gefangen und sofort konserviert werden. Außer ausmetamorphosierten Tieren des ersten Lebenssommers gelangten auch zwei- und dreisommerige Frösche zur Untersuchung. Über die adulten Tiere s. S. 564. Fixiert wurde allgemein im Bouinschen Gemisch oder mit Kaliumbichromat-Formol-Eisessig (Kaformacet, Ciaccio). Das Material wurde mit Paraldehydfuchsin gefärbt, da diese Methode insbesondere bei jungen Entwicklungsstadien der Chromalaunhämatoxylin-Phloxinfärbung überlegen ist.

1. Lebenssommer nach der Ablage. Die erste Differenzierung des Grasfroschepithalamus ist durch die Ausstülpung der Epiphysenendblase (Organon frontale) gekennzeichnet (s. Abb. 4a, b), die nach v. Kupffer bei 2,3 mm langen Larven erfolgt (vgl. Bargmann 1943).

Die folgende Beschreibung beruht auf einem Material von 32 Larven und Kaulquappen von 2,8 mm Länge bis zur Metamorphose, was dem Zeitraum von April bis Juni entspricht (Abb. 4). Bei *2,8—3,5* mm langen Larven wurde eine

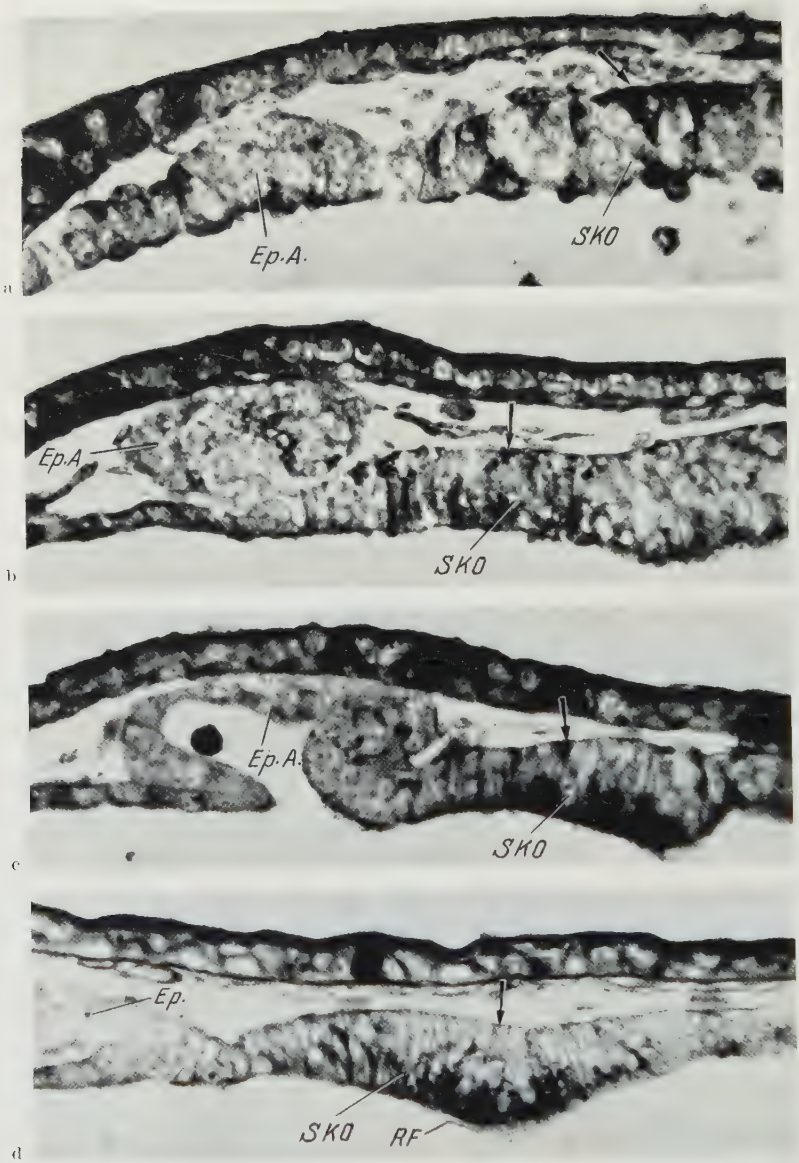


Abb. 4a—h. Individualcyklus des Subkommissurialorgans von *Rana temporaria*. a 4 mm, b 7,5 mm, c 9 mm, d 10,5 mm, e 19 mm, f 35 mm, g 46 mm, h eben ausmetamorphosiertes Tier. Bouin fix., Paraldehydfuchsin-fast green-Orange G. a—f Vergr. 250fach, g—h Vergr. 165fach. Allmähliche Zunahme der Wanddicke durch die Entwicklung der Comm. post. (*Cp.*). *Ep.A.* Epiphysenanlage, aus der zuerst das Stirnorgan hervorgeht; *Ep.* intrakraniale Epiphyse; *SKO* Subkommissuralorgan. Sekret des SKO dunkel, in a—e pigmenthaltig. Erst in f typisches Sekret. ↓ Elektiv färbbare Substanz unter der Membr. limit. ext.; c—e fortschreitende Zelldifferenzierung im SKO. *RF* Reissnerscher Faden. e, f: ↓ elektiv gefärbte Zellausläufer mit sekretgefülltem Endfluß. Im kaudalen verdickten Wandbereich Verlängerung der Ependymfortsätze (+). g, h: nur vereinzelt sekrethaltige Zellausläufer (↑)

Komponente des in allen Wänden des Zentralkanals reichlich vorhandenen Pigmentes durch Paraldehydfuchsin elektiv gefärbt. In der dünnwandigen Anlage

Abb. 4 e—h

des Zwischenhirndaches war noch keine spezifische sekretorische Aktivität zu erkennen. *3—3,5* mm lange Larven wiesen an verschiedenen Stellen des Neural-

rohrepithels ein histologisches Bild auf, das für eine allgemeine sekretorische Aktivität seiner Zellen spricht (Abb. 3). Am apikalen Pol vieler Ependymzellen waren voluminöse, in das Lumen hineinragende Cytoplasmaprotrusionen zu beobachten, die offensichtlich von der Zelle abgeschnürt wurden. Kuppenartige Cytoplasmamassen, die noch durch eine halsartige Zone mit dem apikalen Zellpol zusammenhingen, färbten sich mit der „fast green"-Komponente des Farbgemisches. Neben diesen in Abschnürung befindlichen Blasen lagen der freien Ventrikeloberfläche auch noch optisch leere, von einer grün gefärbten Membran umgebene Vakuolen an. Diese gehen offenbar aus den abgeschnürten Tropfen hervor, nachdem ihr Inhalt zur Bildung der Liquorflüssigkeit beigetragen hat. Die äußere Hülle könnte dabei als ein von der Zelle mitgenommener Cytoplasmaüberzug gedeutet werden. Die in den Binnenräumen des ZNS vorhandenen Liquorgerinnsel zeigten das gleiche färberische Verhalten wie die apikalen Sekretblasen. An der freien Ventrikeloberfläche fanden sich außerdem noch mit Goldorange gefärbte Tropfen und Kugeln. Im Gegensatz zu den größeren Kugeln in der freien Ventrikellichtung standen die kleineren Tropfen und Körnchen noch im Zusammenhang mit dem apikalen Zellpol, dessen Begrenzung nach dem Lumen zu aufgelockert erschien. Die beschriebenen Sekretionserscheinungen waren, wenn auch schon wesentlich schwächer, noch bei einer 4 mm langen Larve zu beobachten, ließen sich dagegen bei den älteren Entwicklungsstadien nicht mehr nachweisen.

Dieser Befund zeigt, daß die Sekretion zu den frühen physiologischen Fähigkeiten der ependymalen Matrix gehört. Über die biologische Bedeutung des mit Paraldehydfuchsin elektiv gefärbten Pigmentes kann nichts ausgesagt werden. Es bleibt im adulten Gehirn lediglich auf bestimmte Kerngebiete des Mittelhirns und auf das dazugehörige Ependym beschränkt und gehört nach dem Ergebnis histochemischer Untersuchungen zur Reihe der Melanine.

4—7 mm lange Larven ließen am Zwischenhirndach eine weitere Differenzierung erkennen; aus elektiv gefärbten Körnchen bestehende Kettenformationen waren kaudal von der Epiphysenanlage zwischen der freien Ventrikeloberfläche und der äußeren Grenzmembran sichtbar. Eine Anhäufung des elektiv gefärbten Stoffes kam auch unter der äußeren Grenzmembran vor (Abb. 4a, b). Da aber dieses Material eine Pigmentkomponente enthielt, konnte nicht einwandfrei entschieden werden, ob bereits ein spezifisches Sekret vorlag.

Angefangen mit 5 mm Länge zeichneten sich die Stellen der späteren Plexusbildung durch eine Lamina epithelialis aus, deren kubische Zellen ebenfalls pigmenthaltige, mit Paraldehydfuchsin färbbare Granula enthielten. Das Organon frontale nahm von 4 bis 7,5 mm Länge an Größe zu und wies ab 6 mm Länge an der freien Ventrikeloberfläche violett gefärbte Fäden, ab 6,5 mm Länge cytoplasmatische, elektiv gefärbte Granula auf (vgl. Oksche 1959/60).

Die Entwicklung des SKO war bei *8—9* mm langen Larven weiter fortgeschritten. Die zur äußeren Grenzmembran aufsteigenden Körnchenstränge zeigten eine deutlichere Zeichnung; unter der äußeren Grenzmembran lagen hier und da dreieckige, elektiv gefärbte Stempel. Dieser Zustand war besonders gut ausgeprägt bei einer *10,5 mm* langen Larve (Abb. 4d), die schon in der 3. und 4. Ventrikel eingestülpte Plexusanlagen sowie einen Epiphysenschlauch aufwies. Die Endfüße erschienen weiter differenziert. Die Zellkerne dieses SKO standen in 1—2 Reihen. Auch das Perikaryon enthielt zwischen dem Zellkern

und der freien Ventrikeloberfläche mit Paraldehydfuchsin gefärbte Körnchen. Es war auch ein deutlicher apikaler Körnchensaum mit einem zarten Reissnerschen Faden sichtbar.

Wies bei den jüngeren Entwicklungsstadien das mit Paraldehydfuchsin elektiv färbbare Material auch im SKO stets eine Pigmentkomponente auf, so war das SKO einer *15 mm* langen Larve schon weniger pigmentreich. Hier lag offenbar auch ein pigmentfreies Sekret des SKO vor. Die Zellen des SKO hatten eine weitere Differenzierung erfahren, die elektiv gefärbten Ausläufer und deren Endfüße waren gut zu erkennen. An der freien Ventrikeloberfläche fand sich ein apikaler Saum mit einem eng anliegenden Reissnerschen Faden.

Bei Stadien von *16—19 mm Länge* nahm die Menge des im Perikaryon lokalisierten Sekretes weiter zu. Starke, sekrethaltige Endfüße bildeten an der äußeren Grenzmembran eine dichte Formation (Abb. 4e). Am Reissnerschen Faden konnte dagegen keine Verstärkung beobachtet werden.

Das erste Neurosekret der Neurohypophyse wurde bei einer 17 mm langen Larve dargestellt.

Bei Stadien von *27—35 mm Länge* machte sich eine Verstärkung der Commissura posterior am kaudalen Ende des SKO bemerkbar. Dieser verdickte Wandabschnitt ragte wulstartig in die Ventrikellichtung und wurde von den verlängerten Fortsätzen der subkommissuralen Ependymzellen durchsetzt, die die äußere Grenzmembran erreichten (Abb. 4f). Das Sekret füllte eine Reihe von Zellfortsätzen und Endfüßen, der basale Zellpol wies kappenartige Körnchenanhäufungen auf. An der freien Ventrikeloberfläche gab es keinen neuen Befund.

43 mm Länge. Im Vergleich zu den jüngeren Entwicklungsstadien konnte an der Basis des SKO eine Zunahme der Sekretschollen verzeichnet werden. Die Zellfortsätze, die im kaudalen verdickten Wandabschnitt bereits eine beachtliche Länge aufwiesen und in gewellten Zügen verliefen, waren im Vergleich zu den 19—35 mm langen Kaulquappen nur schwach elektiv gefärbt. Dasselbe gilt auch für die Endfüße. An der freien Ventrikeloberfläche wurde keine Veränderung verzeichnet.

46 mm Länge. Dieses Entwicklungsstadium zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen der geringen Sekretmenge an der freien Ventrikeloberfläche des SKO und der starken Sekretakkumulation an seiner Basis (Abb. 4g). Zellfortsätze und Endfüße hatten sich nur in dem dünnwandigen rostralen Wandabschnitt deutlich mit Paraldehydfuchsin gefärbt. Im kaudalen Drittel des SKO traten in der am stärksten verdickten Wandstelle erstmalig sekrethaltige bipolare Gliazellen in Erscheinung.

Die Neurohypophyse enthielt viel Neurosekret. Die proximale Neurohypophyse (Eminentia mediana) war noch nicht ausgeprägt. Der Tractus praeoptico-hypophyseus wurde im Infundibulum durch elektiv gefärbte Sekretkörnchen markiert.

Metamorphosestadien (Abb. 4h). *5. Juni.* 41 mm Gesamtlänge (15 mm Schnauze—Kloake). Hintere Extremität 13 mm, vordere Extremität 6 mm.

Im Gegensatz zu dem zarten Körnchensaum an der freien Ventrikeloberfläche, von der kein Reissnerscher Faden abging, fanden sich an der Basis des Subkommissuralorgans große Sekretmassen. Die Ependymfortsätze waren nur im rostralen Teil des SKO elektiv gefärbt, sekrethaltige Endfüße wurden nur ver-

einzelt gesichtet. Im kaudalen Drittel des SKO fielen sekrethaltige bipolare Gliazellen auf.

Die Neurohypophyse enthielt mäßige Sekretmengen.

14. Juni (2 Tiere). 1. 14 mm Länge (Schnauze—Kloake), 8 mm Schwanzstummel, hintere Extremität 17 mm, vordere Extremität 8 mm.

2. 15 mm Länge (Schnauze—Kloake), 8,5 mm Schwanzstummel, hintere Extremität 17 mm, vordere Extremität 6 mm.

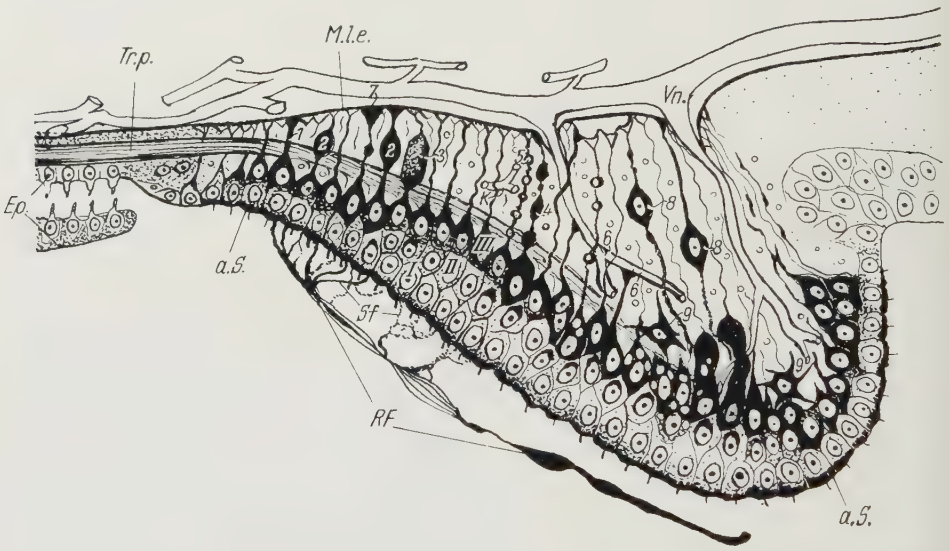


Abb. 5. Schematisierte Darstellung des Subkommissuralorgans der Anuren. Paramedianer Sagittalschnitt. *I* Ventrikelnahe Zellreihe mit dem apikalen Sekretkörnchensaum (*a.S.*), Sekretfäden (*Sf*) und dem Reissnerschen Faden (*RF*); *II* sekretärmere mittlere Zellage; *III* basale Zellreihe mit Fortsätzen und Endfüßen an der Membr. limit. ext. (*M.l.e.*). Ependymfortsätze mit homogener Sekretfüllung (*1*), Auftreibung (*2*), sackartigen Körnchenanhäufungen (*3*), perlschnurartig angeordneten Sekrettropfen (*4*) oder Vakuolen (*5*), Gefäßkontakten (*6*) und sekrethaltigen Endfüßen (*7*). Bipolare (*8*) und sternförmige (*9*) hypendymale Gliazellen. *Ep.* Epiphyse; *Tr.p.* Tractus pinealis; *Vn.* venöse Gefäße; *K* Kapillare

Beide Tiere wiesen übereinstimmend einen gut ausgebildeten Sekretsaum an der freien Ventrikeloberfläche auf, der im kaudalen Drittel des SKO mit einem starken Reissnerschen Faden zusammenhing. Am basalen Pol des SKO wurde reichlich Sekret mit paranucleären Sekretkappen am basalen Kernpol gefunden. Die Zellfortsätze waren nur ganz vereinzelt elektiv gefärbt, die Endfüße sekretfrei.

Zum erstenmal lag eine deutliche ausdifferenzierte proximale Neurohypophyse (Eminentia mediana) vor. Die distale Neurohypophyse wies nur mäßige Sekretmengen auf.

22. Juni (2 Tiere). 1. 13 mm Länge, Schwanzstummel 1 mm, hintere Extremität 15 mm, vordere Extremität 8 mm.

2. 13 mm Länge, Schwanzstummel fehlt, hintere Extremität 18 mm, vordere Extremität 8 mm.

Bei beiden Tieren ging ein starker, aus mehreren Einzelfäden bestehender Reissnerscher Faden aus einem schmalen apikalen Körnchensaum hervor. Die Basis des SKO mit ihren paranucleären Kappen und Sekretmassen war wesentlich sekretreicher als die freie Ventrikeloberfläche.

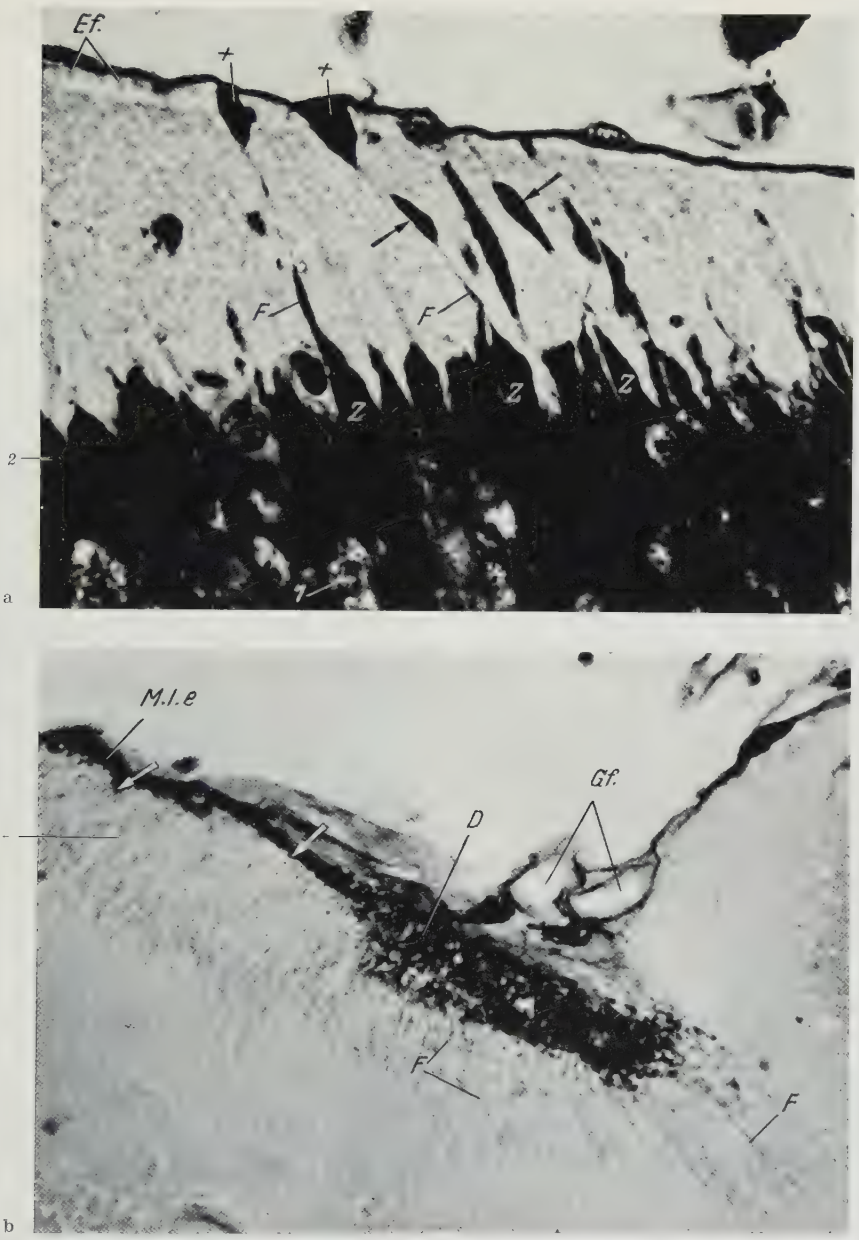


Abb. 6a u. b. a Sekrethaltige Zellfortsätze und Endfüße des Subkommissuralorgans eines adulten Grasfrosches *(Rana temporaria)*. Rostraler dünnwandiger Teil. Sagittalschnitt. Kaformacet fix. Chromalaunhämatoxylin-Phloxin. Vergr. 764fach. *1* Ventrikelnahe Zellagen mit Sekretkörnchen; *2* basale Zellreihe mit homogenen Sekretmassen; *Z* stark aufgetriebener Zelleib, der in einen sekretgefüllten Zellfortsatz ausläuft. *F* Ependymausläufer, die eine solche Sekretstraße bis zur Membr. limit. ext. zu verfolgen gestatten, wo sekrethaltige Endfüße (+) vorliegen. *Ef.* Sekretfreie Endfüße. In den sekretgefüllten Fortsätzen finden sich Anschwellungen (↑) und diffus verteilte Körnchen. b Sekretdepot unter der äußeren Grenzmembran im Subkommissuralorgan eines adulten Laubfrosches *(Hyla arborea)*. Kaudaler dickwandiger Abschnitt. Sagittalschnitt. Bouin fix., Paraldehydfuchsin-fast green-Orange G. Vergr. 180fach. Der ependymale Zellverband liegt außerhalb der Bildebene. + Zahlreiche sekrethaltige Zellfortsätze des SKO; ↓ sekrethaltige Endfüße; *D* depotähnliche Sekretanhäufung an der äußeren Grenzmembran (*M.l.e.*); sekrethaltige Zellfortsätze (*F*); *Gf.* Gefäße

Die proximale und die distale Neurohypophyse zeichneten sich durch ihren Neurosekretreichtum aus.

Ende des ersten Lebenssommers. Oktober. Im Vergleich zu frisch metamorphosierten Temporarien fiel die Wandverdickung durch die weitere Entwicklung der Comm. post. auf. Der ganze Zellverband des SKO zeigte eine Höhenzunahme und eine mehrreihige Anordnung der Zellkerne. Der basale Pol des SKO war sekretreicher als der apikale Pol an der freien Ventrikeloberfläche, wenn auch diese Anhäufung auf das Perikaryon beschränkt blieb und nur vereinzelte sekrethaltige Ependymfortsätze beobachtet wurden.

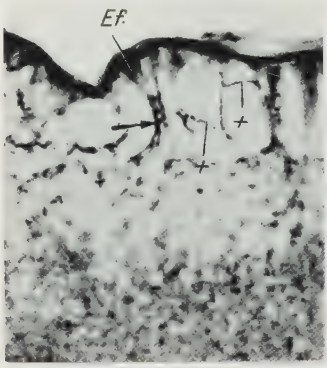


Abb. 7. Subkommissuralorgan der *Rana temporaria* (adult). Sekrethaltige Zellfortsätze und Endfüße an der äußeren Grenzmembran. Sagittalschnitt. Kaformacet fix., Chromalaunhämatoxylin - Phloxin. Vergr. 764fach. Die hellen Räume sind Gliakammern. Dunkel gefärbte Sekretkörnchen im Zellausläufer (↑) und Endfuß (*Ef.*); + feine sekrethaltige Seitenästchen

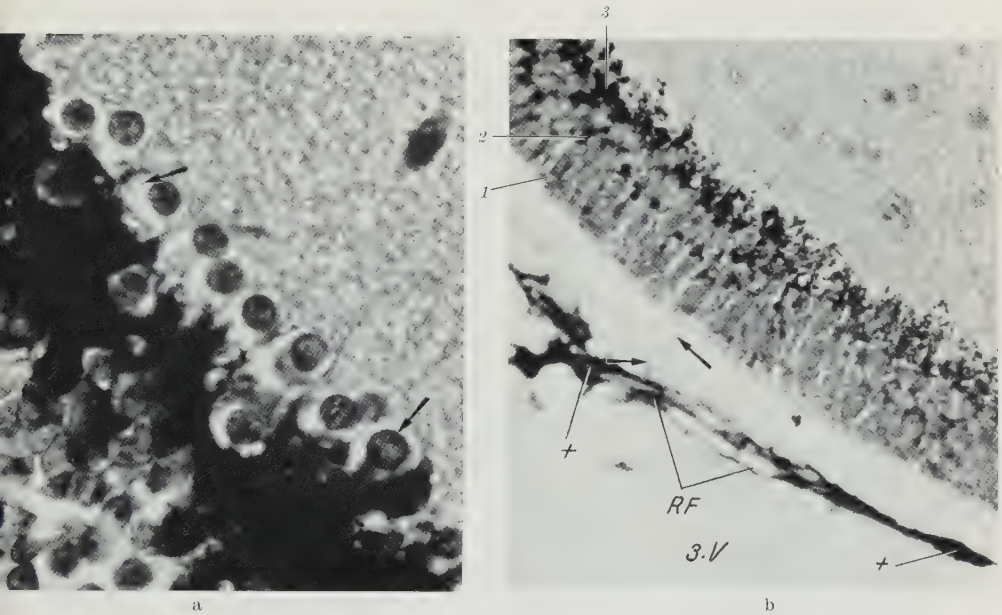
Damit ist ein Zustand erreicht, der im Prinzip den Verhältnissen beim adulten Grasfrosch entspricht. Dieses Bild erfährt im Laufe des zweiten und dritten Sommers mit Ausnahme einer weiteren Dickenzunahme der Comm. post. keine weitere Veränderung.

Das SKO **adulter** *Temporarien* wird gebildet von epithelialen, an der freien Ventrikeloberfläche und im Inneren des ependymalen Verbandes liegenden Zellen und einer basalen Zellformation aus ependymalen Tanycyten (Abb. 5). Die Tanycyten sind die sekretreichsten Elemente. Sekrethaltige Zellfortsätze gehören im rostralen, dünnwandigen Abschnitt des SKO zum normalen Bild. Dieser Zustand der Zellausläufer kann nicht einfach durch eine Rückstauung des Sekretes erklärt werden, da diese auch dann Sekret enthalten, wenn das Perikaryon keinerlei Anzeichen einer Sekretüberladung aufweist. Der wechselnde Füllungszustand und die veränderliche Beschaffenheit (homogen bis körnig) des Sekretes im Zellfortsatz enthalten einen Hinweis auf die funktionelle Bedeutung dieser Sekretlokalisation (vgl. Oksche 1959/60). Sekrethaltige Endfüße sind ebenfalls keine Seltenheit (Abb. 6a). Diese können sowohl durch homogene Sekretmassen stark aufgetrieben sein als auch feine, elektiv färbbare Granula enthalten (Abb. 7). Gelegentlich entstehen unter der Membrana limit. ext. Gliakammern, in denen sehr zarte, mit elektiv gefärbten Körnchen beladene Zellausläufer des SKO sichtbar werden, die parallel zur äußeren Oberfläche verlaufen und wohl als Seitenäste des Ependymfortsatzes (vgl. Fleischhauer 1958) aufzufassen sind (Abb. 7).

Aus dem individualzyklischen Temporarien-Material geht klar hervor, daß alle zur Sekretsynthese befähigten Zellen des SKO der ependymalen Matrix entstammen. Eine in der Entwicklung erfolgte Einwanderung sekretorisch aktiver mesenchymaler Elemente scheidet mit Sicherheit aus. Die Zellen des Neuralrohrepithels, die den Zentralkanal auskleiden, können sich aber in zwei verschiedene Richtungen differenzieren: 1. in Ganglienzellen, 2. in Gliazellen (Ependymzellen, Astrocyten und Oligodendrocyten).

Im ependymalen Zellverband des Temporarien-SKO war unsere Aufmerksamkeit ganz besonders auf die eigenartigen, mit einem langen Zellfortsatz aus-

gestatteten Ependymzellen der basalen Zellreihe gerichtet, die wir hier nach dem generellen Vorschlag Horstmanns (1954) als Tanycyten bezeichnen. Sie entsprechen morphologisch den „supportive spongioblasts" von Penfield (1932). Die Tanycyten des Temporarien-SKO haben einen für diese Zellart typischen Bau; sie weisen unter anderem einen Endfuß an der äußeren Grenzmembran auf. Nach den neuen Untersuchungen von Horstmann (1954), Fleischhauer (1958; Nachweis von typischen submikroskopischen intracellulären Filamenten,



a b

Abb. 8a u. b. Subkommissuralorgan der *Rana temporaria* (adult). a Basale Zellreihe mit dunklen Sekretmassen und anliegenden geschwollenen hypendymalen Zellen (↓). Sagittalschnitt. Bouin fix., Chromalaunhämatoxylin-Phloxin. Vergr. 590fach. b Reissnerscher Faden. Sagittalschnitt. Bouin fix. Chromalaunhämatoxylin-Phloxin. Vergr. 350fach. *1* Apikale Zellreihe; *RF* Reissnerscher Faden mit zahlreichen netzartig verwobenen Sekretstrukturen; ↑ Verbindung blaß gefärbter Fädchen mit dem apikalen Zellpol an der freien Ventrikeloberfläche; + starke Sekretakkumulation; *3. V* 3. Ventrikel; *2* innere Zellage mit basalwärts gerichteten paranucleären Sekretkappen; *3* basale sekretreiche Zellreihe

die als Grundelemente der Gliafibrillen und -fasern aufzufassen sind) und Oksche (1958; Nachweis einer Cytodynamik, die weitgehend an Astrocyten erinnert) besteht kein Zweifel, daß die Tanycyten zur Neuroglia gehören. Sie sind zwar typisch für das ZNS niederer Wirbeltiere, aber als cytologische Einheiten hoch differenziert, ausgeprägt (Oksche 1958).

Während der Embryonalentwicklung wandern vereinzelte Zellen von der basalen Zellreihe des Temporarien-SKO aus. Diese ausgewanderten Zellen haben ihre Fähigkeit, ein für das SKO charakteristisches Sekret zu bilden, nicht verloren. Legen wir der Klassifizierung dieser Zellen das Entwicklungsschema der Glia von Penfield (1932) zugrunde, so finden sich sowohl ausgewanderte Zellen vom Charakter polarer (bipolarer) Spongioblasten, als auch apolarer Wanderspongioblasten und Astroblasten (s. Abb. 5, 26). Daß diese Zellen weder Neurofibrillen (im Bodian-Präparat), noch Nissl-Substanz aufweisen, kann als ein weiterer Beweis ihres Gliacharakters gelten. Wenn auch die Unterscheidung von

Ganglien- und Gliazellen gerade bei Anuren auf größere Schwierigkeiten stößt, sind wir auf Grund des histologischen Gesamteindruckes sicher, daß hier die aus dem Ependymverband ausgewanderten sekretorisch aktiven Zellen keine Nervenzellen darstellen.

Trotz der Auswanderung von Ependymzellen kommt es beim Grasfrosch nicht zur Ausbildung einer stärkeren hypendymalen Zellformation (Abb. 5). Neben vereinzelten sekrethaltigen Gliazellen im rostralen Drittel des SKO, die nicht selten ganz dicht unter der äußeren Grenzmembran liegen, sind nur noch die nicht sehr zahlreichen, meist bipolaren Gliazellen des kaudalen Drittels zu

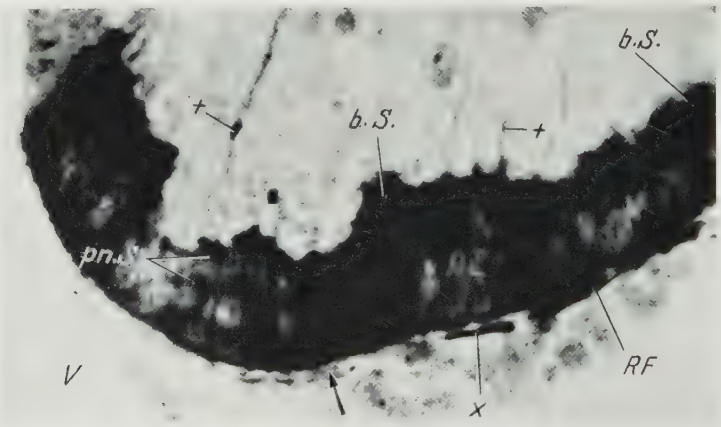


Abb. 9. Subkommissuralorgan einer *Rana temporaria* (Metamorphosestadium) mit Reissnerschem Faden. Sagittalschnitt. Bouin fix. Paraldehydfuchsin-fast green-Orange G. *b.S.* basale Sekretanhäufung; + sekrethaltige basale Zellfortsätze; *pn.S.* paranucleäre Sekretkappen; *RF* Reissnerscher Faden; ↑ mehrere feine nebeneinander verlaufende Fadenstrukturen; × verdickte homogene Anschwellung. Vergr. 720fach

nennen, die zum erstenmal kurz vor der Metamorphose beobachtet wurden. Ihre Fortsätze können gelegentlich zu einem bündelartigen Verband zusammengefaßt sein. Es ist erstaunlich, wie lang bei Temporarien die ependymalen Zellfortsätze im kaudalen Drittel des SKO werden können (Abb. 5); die direkte Verbindung der basalen Zellage mit der äußeren Grenzmembran wird nicht aufgegeben. An Stellen mit besonders deutlicher Fortsatzzeichnung springt die basale Zellreihe nicht selten hügelartig gegen die äußere Grenzmembran vor, wodurch der Abstand, wenn auch nicht wesentlich, verringert wird. Sehr bemerkenswert sind Kontakte sekrethaltiger Ependymfortsätze mit der Gefäßwand, die im bogenförmigen oder gewundenen Verlauf berührt wird (Abb. 5). An den subkommissuralen Gefäßen der Temporarien werden Tanycytenendfüße nicht ausgebildet. Die beobachteten Gefäßkontakte entsprechen den von Horstmann (1954) bei Selachiern allgemein vorgefundenen Gefäßbeziehungen der Tanycyten. Eigenartige blasige Hypendymzellen s. Abb. 8a.

Faßt man die im Individualzyklus des Grasfrosches gemachten Beobachtungen zusammen, so kann man sagen, daß das SKO bereits sehr früh sekretorisch aktiv ist. Mit elektiv gefärbtem Material gefüllte Endfüße treten gleichzeitig mit den ersten feinen Körnchen an der freien Ventrikeloberfläche auf. Die sekrethaltigen Endfüße können keinen Stauungszustand bedeuten, da der

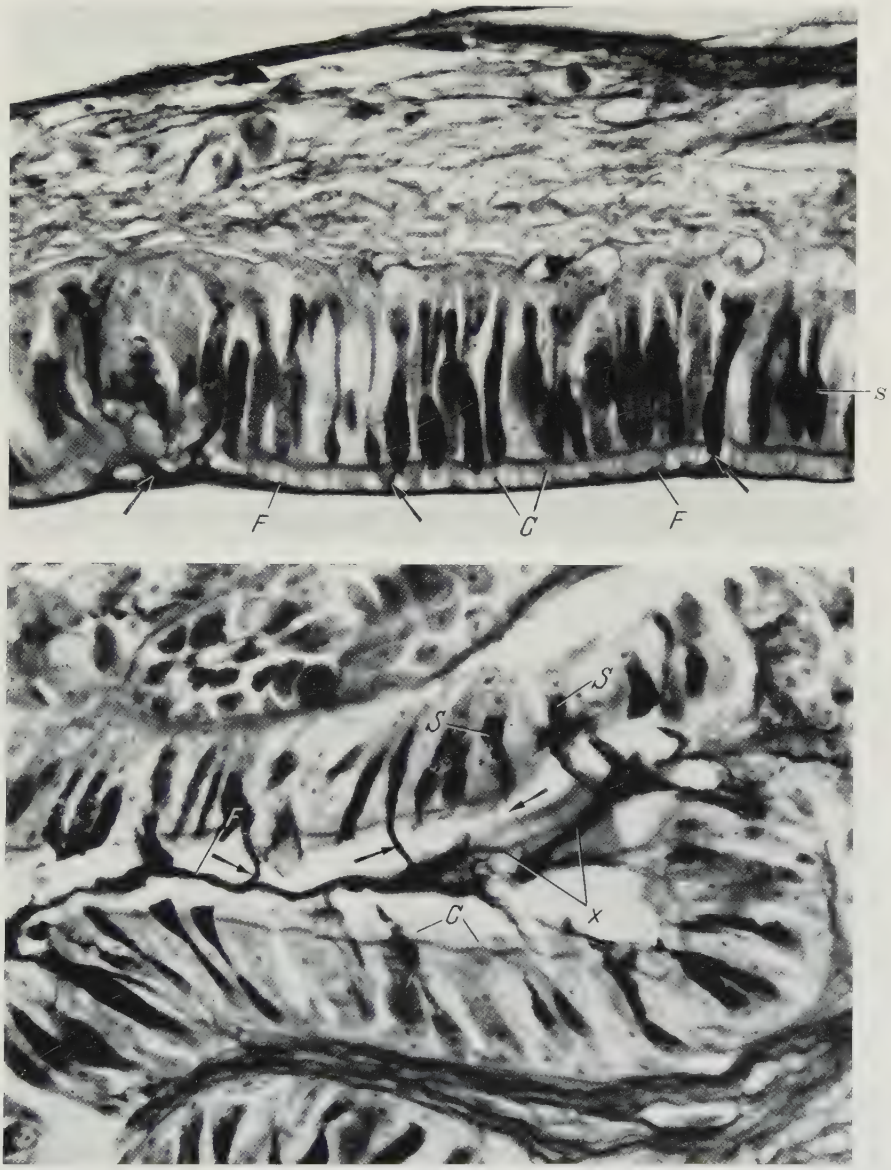


Abb. 10a u. b. Bildung von Sekretfäden an der freien Oberfläche des Rachendachepithels von *Rana temporaria* (Metamorphosestadium). (Objekt wie in Abb. 9.) Sagittalschnitte. Bouin fix. Paraldehyd-fuchsin-fast green-Orange G. a Glatte Epitheloberfläche. *S* Intracelluläre Sekretmassen; *C* Cilien (sekretfrei); *F* plattenförmig geronnenes Sekret, im Sagittalschnitt fadenförmig; ↑ verschieden starke Verbindungsfäden, kontinuierliche Sekretstraßen vom Zellkern bis zum Hauptfaden. Vergr. 525fach. b Epithelbucht. *S* Paranucleäres Sekret; *C* Cilien; *F* zentraler Sekretfaden im Lumen der Epithelbucht; × Aufsplitterung des Sekretfadens; ↑ verschieden starke Verbindungsfäden, die eine kontinuierliche Sekretstraße von der Zelle bis zum Hauptfaden herstellen. Vergr. 525fach

basale Pol der im einreihigen Verband angeordneten Zellen des SKO auf dieser Entwicklungsstufe noch sekretarm ist. Wenn kurz vor der Metamorphose am basalen Zellpol Sekret in dichten Schollen abgelagert wird, geht die elektive

Zeichnung der Zellfortsätze zurück. Schon dieser Befund schließt die Möglichkeit einer einfachen, mechanischen Rückstauung des Sekretes bis in den Endfuß hinein aus. Die Fortsätze müssen vielmehr als Sekretstraßen aufgefaßt werden, die der Verbindung des SKO mit der äußeren Grenzmembran und den Gefäßen dienen. An der äußeren Grenzmembran werden die Stempel des SKO von der in den Lücken der primitiven Meningen befindlichen Flüssigkeit umspült, die auch die großen Gefäßstämme (Venen) umgibt, die in der Pialamelle die vom Parenchym des SKO emporsteigenden Äste sammeln. Der Beginn der sekretorischen Aktivität des SKO folgt kurz auf die morphologische Differenzierung des Organon frontale. Wenn der definitive Epiphysenschlauch in Erscheinung tritt, erfährt auch das SKO eine weitere zelluläre Differenzierung und Steigerung seiner sekretorischen Aktivität (10,5 mm Länge). Von diesem Zeitpunkt gerechnet trat das erste Sekret in der Neurohypophyse erst 14 Tage später auf (17 mm Länge).

Nach den Befunden im Individualzyklus des Grasfrosches kann ich in der morphologischen Struktur des Reissnerschen Fadens (Abb. 8b, 9) keinen besonderen biologischen Apparat, sondern nur an der Oberfläche geronnenes Sekret sehen.

Ähnlich gefärbte, noch besser ausgeprägte Sekretfäden konnte ich bei jungen Fröschen auch an der Oberfläche des Flimmerepithels am Rachendach beobachten, dessen Becherzellen ebenfalls mit einem elektiv dargestellten Sekretstoff gefüllt sind (Abb. 10a, b). An glatten, weitflächigen Oberflächen wurde hier nur ein Einzelfaden beobachtet, der nur ab und zu durch einen Sekretfaden mit dem apikalen Zellpol zusammenhing (Abb. 10a). Dagegen strahlten an eingebuchteten Schleimhautstellen zahlreiche Sekretfäden zu einer groben, etwas unregelmäßigen zentralen Fadenstruktur oder einem Fadenbündel zusammen (Abb. 10b). Die Cilien waren stets völlig sekretfrei. Hier liegt ein ähnlicher Fall der Sekretabsonderung vor wie an der freien Ventrikeloberfläche des SKO (Abb. 9). Die Form des zu einem Faden geronnenen Sekretstromes wird von der Beschaffenheit und Weite der benachbarten Lichtung entscheidend geprägt (vgl. dazu Hofer 1958). Auch im SKO sind die Sekretkörnchen nur der Oberfläche von Cilien angelagert und liegen nicht in den Cilien selbst.

b) Hyla arborea L., *und Bufo bufo* L.

Von den anderen untersuchten Anurenarten sind hier noch die Verhältnisse bei *Hyla arborea* und *Bufo bufo* erwähnenswert. Bei *Hyla* sind die peripheren Zellausläufer und deren Endfüße ein noch stärker bevorzugter Ort der Sekretlagerung als bei *Rana temporaria*. Sie scheinen an ihrer Peripherie stärker und feiner verzweigt zu sein als beim Grasfrosch. In diesem peripheren, an der Grenzmembran liegenden Bereich wurden bei *Hyla* depotähnliche Anhäufungen feinkörnigen, elektiv gefärbten Materials dargestellt (Abb. 6b), die von Fall zu Fall ganz deutlichen Mengenschwankungen unterlagen. Im kaudalen Drittel des *Hyla*-SKO kommen so lange, gut ausgebildete Ependymfortsätze vor, daß die Differenzierung bipolarer hypendymaler Elemente ausbleibt.

Dagegen gibt es bei *Bufo bufo*, angefangen mit dem mittleren Drittel des SKO nicht nur zahlreiche bipolare, sondern auch astrocytäre hypendymale Gliazellen. In dem rostralen dünnwandigen Drittel erreichen noch alle wellenartig

gewundenen Ependymfortsätze die äußere Grenzmembran. Weiter kaudal, wo die Ventrikelwand durch die Comm. post. erheblich verdickt wird, sind dagegen die Gefäßkontakte der Ependym- und Gliazellfortsätze gut ausgebildet (Abb. 1 a, b).

Das Sekret des SKO ist bei *Hyla arborea* und *Bufo bufo* feinkörniger als bei *Rana temporaria*.

Beurteilung. Das SKO der Anuren ist besonders einfach gebaut und bereits im frühen Larvalstadium sekretorisch aktiv. Diese Aktivität ist bei *Rana temporaria* während des ganzen Individualzyklus so stark, daß an einer wesentlichen biologischen Bedeutung des Anuren-SKO nicht gezweifelt werden kann. Neben der Absonderung des Sekretes in den Ventrikel (Reissnerscher Faden) kann in der wechselnden Füllung der ependymalen Zellfortsätze mit Sekret eine wesentliche Leistung des SKO erblickt werden. Da Verallgemeinerungen gefährlich erscheinen, wird diese Annahme vorerst nur für den Grasfrosch, den Laubfrosch und für die Erdkröte ausgesprochen.

II. Cyclostomata

Das SKO der Cyclostomen wurde mit der Chromalaunhämatoxylin-Methode bereits von Wingstrand (1953) *(Petromyzon fluviatilis)*, Olsson (1955) *(Ammocoetes, Myxine)* und Adam (1957) *(Petromyzon fluviatilis, Ammocoetes, Myxine)* untersucht. Das SKO von *Petromyzon fluviatilis* ist paarig (Wingstrand, Adam), weist einen mit dem apikalen Sekretsaum zusammenhängenden Reissnerschen Faden auf (Olsson) und enthält auch an seiner Basis elektiv gefärbte Sekretgranula (Adam). Mit Sekretkörnchen beladene Ependymfortsätze wurden von den zitierten Autoren nicht beobachtet. Adam beschreibt das Hypendym des Cyclostomen-SKO als ein lockeres, dem ependymalen Zellverband benachbartes Gliagerüst, ohne weitere Angaben über den Charakter der hypendymalen Gliazellen zu machen.

a) Petromyzon planeri, Ammocoetes

Mit der Chromalaunhämatoxylin-Methode fand ich bei 3 Ammocoeten (25 mm, 32 mm und 38 mm Länge) in der äußeren Zellreihe des SKO vereinzelte feine Sekretgranula am ventrikelfernen Pol des Zellkerns, dagegen keinen apikalen Sekretsaum, keinen Reissnerschen Faden und keine elektive Körnchenzeichnung der Ependymfortsätze. Nur der 25 mm lange *Ammocoetes* zeichnete sich durch eine stärkere Akkumulation der Sekretkörnchen an der Basis des SKO aus. Von den Hypendymzellen war nur der runde Zellkern zu erkennen; sie enthielten kein Sekret.

Neue Befunde wurden am SKO eines älteren *Ammocoetes* von 130 mm Länge erhoben (Abb. 11). Bei diesem Tier fand sich rostral vor der paarigen Formation des SKO ein leistenartiger, nicht weiter unterteilter Ependymbezirk, der, ähnlich wie der paarige Teil, elektiv gefärbtes Sekretmaterial enthielt. An dieser Stelle war die Ventrikelwand so dünn, daß die zylindrischen epithelähnlichen Zellen, die durch ihre starke basale Sekretstapelung auffielen, fast die Membr. limit. superfic. erreichten. Ein apikaler Körnchensaum ließ sich dagegen nicht nachweisen. Im Gegensatz zu dem dünnwandigen, rostralen Abschnitt, wurden die paarigen Formationen des SKO durch den dicken Wulst der Comm. post. von der Membrana limit. superfic. getrennt.

Dieser dickwandige Abschnitt des SKO enthielt sekrethaltige hypendymale Zellen. Ihr stark aufgetriebenes, mit homogenem Sekret gefülltes Perikaryon verjüngte sich jeweils in 2 Fortsätze, von denen der eine ventrikelwärts, der

andere peripherwärts gerichtet war. Sofern noch eine einzige Zelle in der Lage war, die Commissur zu durchsetzen, reichte sie mit dem zentralen, körnchenhaltigen Fortsatz an den basalen Pol des SKO heran, wogegen der periphere Fortsatz bis zur äußeren Grenzmembran aufstieg. Im Bereich des stärksten Kommissurenwulstes bildeten mehrere sekrethaltige bipolare Elemente Zellketten, die die Comm. post. überbrückten (Abb. 11, s. +).

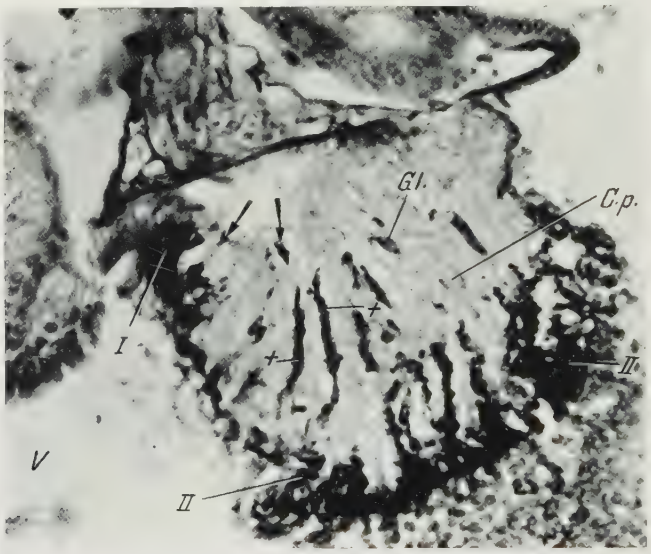


Abb. 11. Subkommissuralorgan eines älteren *Ammocoetes* von 130 mm Länge. Sagittalschnitt. Formol fix., Bouin nachfix. Chromalaunhämatoxylin-Phloxin. Vergr. 224fach. *V* Ventrikellichtung; *I* sekretreicher ependymaler Zellverband im dünnwandigen rostralen Wandabschnitt; ↓ Sekret unter der äußeren Grenzmembran; *II* sekretreicher ependymaler Zellverband im Bereich des dicken Wulstes der Comm. post. (*C.p.*); *Gl.* bipolare sekrethaltige Gliazelle; + Ketten bipolarer, elektiv gefärbter Gliazellen, durch die eine Sekretstraße bis zur äußeren Grenzmembran entsteht

b) Petromyzon fluviatilis L. *(adult, 365 mm Länge)*

Der dünnwandige, dem paarigen Teil des SKO vorgelagerte Ependymabschnitt zeigte auch hier wieder epithelähnliche, zylindrische Zellen, deren basaler Pol nur durch eine ganz dünne Faserzone von der äußeren Grenzmembran getrennt war. Die dichteste Anhäufung der mit Chromalaunhämatoxylin gefärbten Granula lag eindeutig am ventrikelfernen Zellpol. Mit der allmählichen Dickenzunahme der Ventrikelwand in rostrokaudaler Richtung wurde das sekretorische ependymale Epithel allmählich durch zylindrische Ependymzellen abgelöst, deren Perikaryon an der Basis in einen kurzen, spießartigen Fortsatz auslief. Diese Fortsätze, die in kaudaler Richtung immer länger wurden, waren bis zu ihrem spitzen Ende von kettenartig angeordneten Sekretgranula ausgefüllt. Im paarigen Teil des SKO drangen zarte, elektiv gefärbte Ependymfortsätze zwischen die Kommissurenbündel vor, konnten aber nur etwa bis zur Hälfte der Ventrikelwand verfolgt werden. Hier fanden sich in ihrer Nachbarschaft mit Sekretkörnchen beladene bipolare oder multipolare Zellen. Obwohl die Endfüße in diesem Fall kein Sekret enthielten, war die ventrikelnahe Fläche des SKO eindeutig sekretärmer als die Basis.

Beurteilung. Sekrethaltige hypendymale Gliazellen, die in Verbindung mit dem ependymalen Teil des SKO stehen, können auch bei niederen Wirbeltieren vorkommen. Im Sagittalschnitt zeigte sich bei *Ammocoetes* und *Petromyzon fluviatilis* ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Dicke der Ventrikelwand und dem Zelltyp des sezernierenden SKO-Parenchyms. Das Erkennen sekretorischer Hypendymzellen wurde bei den untersuchten Cyclostomen durch das Vorliegen großer Sekretmengen begünstigt.

III. Elasmobranchii, Selachii

Halaelurus chilensis (Guichenot)

Das SKO von *Halaelurus chilensis* erwies sich als ein vorzügliches Studienobjekt aus folgenden Gründen: 1. Sein Flächenareal ist beträchtlich. 2. Seine Zellen sind sehr groß und lassen die Sekretbildung besonders gut verfolgen. 3. Es zeigt ausgeprägte Gefäßbeziehungen. 4. Die Dicke der ihm zugeordneten Ventrikelwand nimmt in rostrokaudaler Richtung sehr stark zu.

In dem untersuchten Gehirn folgte auf die sehr einfach gebaute, schlauchförmige Epiphyse ein hufeisenförmiges, hohes SKO. Seine apikale, dem Liquor zugekehrte Grenzfläche war durch einen breiten, aus feinen Sekretkörnchen bestehenden Saum gekennzeichnet. Wesentlich größere Sekretmengen fanden sich jedoch basal vom Zellkern, wo meistens der ganze ventrikelferne Zellpol von Sekretgranula oder homogen aussehenden kolloidähnlichen Massen ausgefüllt wurde. Dieses Bild war besonders ausgeprägt in der äußersten Zellreihe (Abb. 12a), wobei der Eindruck entstand, als ob die hohen, zylindrischen Zellen einen Sekrethut trügen. Im Gegensatz zu den blaugrau getönten Ansammlungen von Sekretkörnchen und -schollen, färbten sich die homogenen Sekretmassen mit Chromalaunhämatoxylin intensiv blauviolett. Am Scheitelpunkt des hufeisenförmig angeordneten Zellverbandes lag das rostrale Drittel des SKO frei an der äußeren Oberfläche des Gehirns, direkt unter der äußeren Grenzmembran. Zuweilen schien der basale, sekretgefüllte Pol sogar breitflächig der Membrana limitans superficialis aufzusitzen. Häufiger verjüngte sich aber die Zellbasis in einen sekretgefüllten kegel- oder keulenförmigen Fortsatz, der zuletzt an der äußeren Grenzmembran auslief. An der lateralen, dickwandigen Begrenzung des SKO stellten ähnliche sekrethaltige Zellausläufer Kontakte mit den zahlreichen Gefäßen her. Zellen mit direkten Gefäßbeziehungen schienen besonders viel Sekret zu enthalten, so daß das Gefäßufer nicht selten von Sekretmassen eingeschlossen war. In der Umgebung dieser Gefäße wurden vereinzelt auch vom ependymalen Verband des SKO losgelöste Gliazellen beobachtet.

Mit dem Auftreten der Comm. post. wurde das SKO von der freien Oberfläche abgedrängt. Solange die Verdickung der Ventrikelwand noch unwesentlich blieb, durchsetzten einzelne oder auch gebündelte Ependymfortsätze die Comm. post. und stiegen bis zur Membrana limit. superfic. empor. Noch weiter kaudal wurden diese Fortsätze von in gleicher Richtung orientierten hypendymalen Zellen abgelöst, die häufig eine bipolare, spindelförmige Gestalt zeigten (Abb. 12b). Sekretkörnchen ließen sich sowohl im Perikaryon als auch in den Fortsätzen der hypendymalen Gliazellen nachweisen. Die Zellen des nunmehr unter der mächtigen Comm. post. liegenden SKO wurden immer unregelmäßiger und ärmer an basalem Sekret. Gleichzeitig nahm die Stärke des erst im mittleren

Abschnitt des SKO aufgetretenen Reissnerschen Fadens zu. An seinem kaudalen Ende erschien das SKO infolge Sekretverarmung des ependymalen Verbandes und Auflockerung der hypendymalen Formationen zunehmend inaktiver, bis es allmählich in das gewöhnliche Ventrikelependym überging.

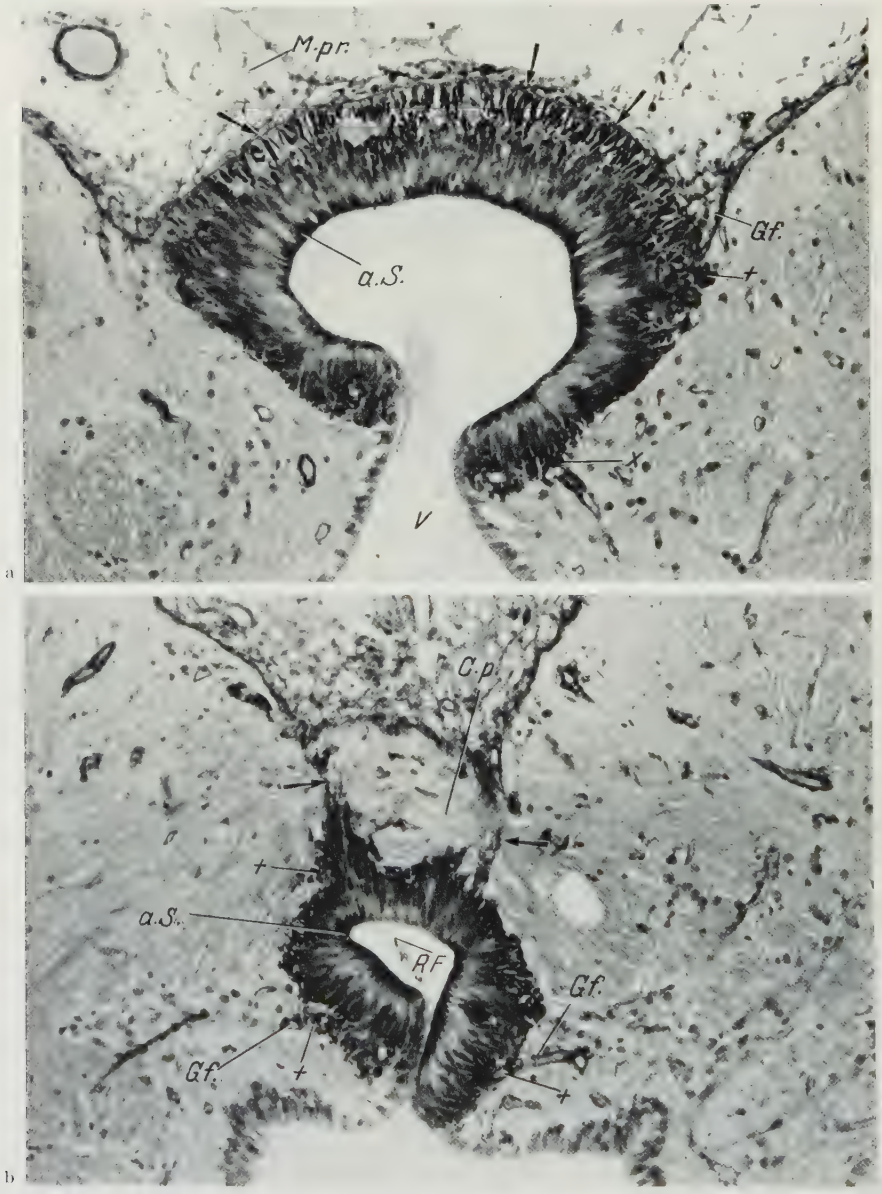


Abb. 12a u. b. Subkommissuralorgan eines Haies *(Halaelurus chilensis)*. Frontalschnitt. Bouin fix., Chromalaunhämatoxylin-Phloxin. Vergr. 140fach. a Abschnitt vor der Comm. post. Beachte die oberflächennahe Lage des hufeisenförmigen Zellverbandes. ↑ Sekrethaltige Zellausläufer, die die äußere Grenzmembran erreichen; *M.pr.* Meninx primitiva; *Gf.* Gefäß. In der Umgebung der Gefäße besonders dichte Sekretanhäufung (+, ×). *V* Ventrikellichtung; *a.S.* apikaler Sekretsaum. b Abschnitt im Bereich der stärksten Verdickung der Comm. post. (*C.p.*). (Objekt und Methode wie in Abb. 12a.) ↑ Ketten sekrethaltiger hypendymaler Gliazellen; *Gf.* Gefäß; + basale Sekretansammlung; *a.S.* apikaler Sekretsaum; *RF* Reissnerscher Faden. Vergr. 140fach

Beurteilung. Die Sekretanhäufung an der Membrana limit. superfic. im SKO von *Halaelurus chilensis* und an den basalen Gefäßen kann dem histologischen Bild nach nicht als Stapelung für eine spätere Sekretabgabe in den Ventrikel oder als Rückstauung gedeutet werden. Elektiv färbbares Material fand sich auch in den Endkeulen der Zellausläufer. Auffallend ist, daß das SKO auch noch im Bereich der stärkeren Comm. caud. einen Kontakt mit der äußeren Grenzmembran sucht, zuerst durch Ependymfortsätze, später durch einzelne hypendymale Gliazellen und zuletzt durch Ketten solcher Zellen. Die Aktivität des SKO nimmt bei *Halaelurus* mit der Dickenzunahme der Ventrikelwand allmählich ab.

IV. Reptilia, Lacertilia

Chalcides ocellatus Forsk.

Der Vergleich des embryonalen und adulten SKO wurde an sagittalen und frontalen Schnittserien durchgeführt.

Sagittale Schnittrichtung. Embryo, 32 mm Länge. Chromalaunhämatoxylin. Das SKO folgte nach einer kurzen ependymalen Übergangszone auf die hohle, aber nicht mehr mit der Ventrikellichtung kommunizierende Epiphyse. Es bestand aus hohen Ependymzellen in Anordnung eines mehrreihigen Epithels. Die basale Grenze des SKO war an zahlreichen Stellen durch geweihartige Zellkomplexe nach dorsal verschoben. Durch solche stammartigen Zellverbände und ihre Ausläufer entstanden breite, peripherwärts gerichtete Zellstraßen, die allerdings die äußere Grenzmembran nicht erreichten. Diese letzte Teilstrecke der Ventrikelwand wurde durch typische Ependymfortsätze überbrückt, die den am weitesten distal gelegenen Zellen des Astwerkes entstammten. Mit der Chromalaunhämatoxylinmethode ließen sich in den breiten Zellstraßen, ähnlich wie in dem ependymalen Hauptverband, Sekretkörnchen am basalen Pol des Zellkernes nachweisen. Dagegen enthielten die feinen Ependymausläufer kein mit Chromalaunhämatoxylin färbbares Material. Am apikalen Pol fand sich kein durchgehender Sekretsaum. Ein Reissnerscher Faden wurde nicht beobachtet.

Adultes Tier. Chromalaunhämatoxylin, Paraldehydfuchsin, Molybdänhämatoxylin (Held), Eisenhämatoxylin. Das SKO der geschlechtsreifen Tiere schien im Vergleich zum Embryo viel unscheinbarer, was in erster Linie auf dem Niedrigerwerden des ganzen ependymalen Verbandes beruht. Außerdem war das kaudale Ende der Comm. post. nicht mehr von den Zellen des SKO bedeckt: die breiten peripheren Zellstraßen fehlten. Ein Überrest der embryonalen Zellverbände war nur rostral, im Anschluß an das dünnwandige Überleitungsstück zu bemerken. Hier kam ein schornsteinartiger Zellkomplex mit seiner Spitze nahe an die äußere Grenzmembran heran. Im übrigen wurde die Comm. post. nur von typischen feinen, zum Teil gewellten Ependymausläufern durchsetzt. Im kaudalen Abschnitt des SKO entsprangen sie zum Teil von zackenartig nach dorsal vorspringenden Zellkegeln, möglicherweise Überresten der im Embryonalzustand vorhandenen starken Stämme. Mit Chromalaunhämatoxylin wurden im adulten SKO ähnliche paranukleäre Körnchenkappen angefärbt wie bei dem oben beschriebenen Embryo. Die Ependymfortsätze enthielten kein mit Chromalaunhämatoxylin färbbares Material, jedoch hier und da mit Paraldehydfuchsin darstellbare körnige Sekreteinlagerungen. Eine aktive hypendy-

male Zellformation konnte nicht beobachtet werden. Im Ventrikellumen wurde eine aus mehreren feinen Fäden bestehende Fadenstruktur dargestellt.

Dieses Material kann durch *Frontalserien* (Chromalaunhämatoxylin) ergänzt werden.

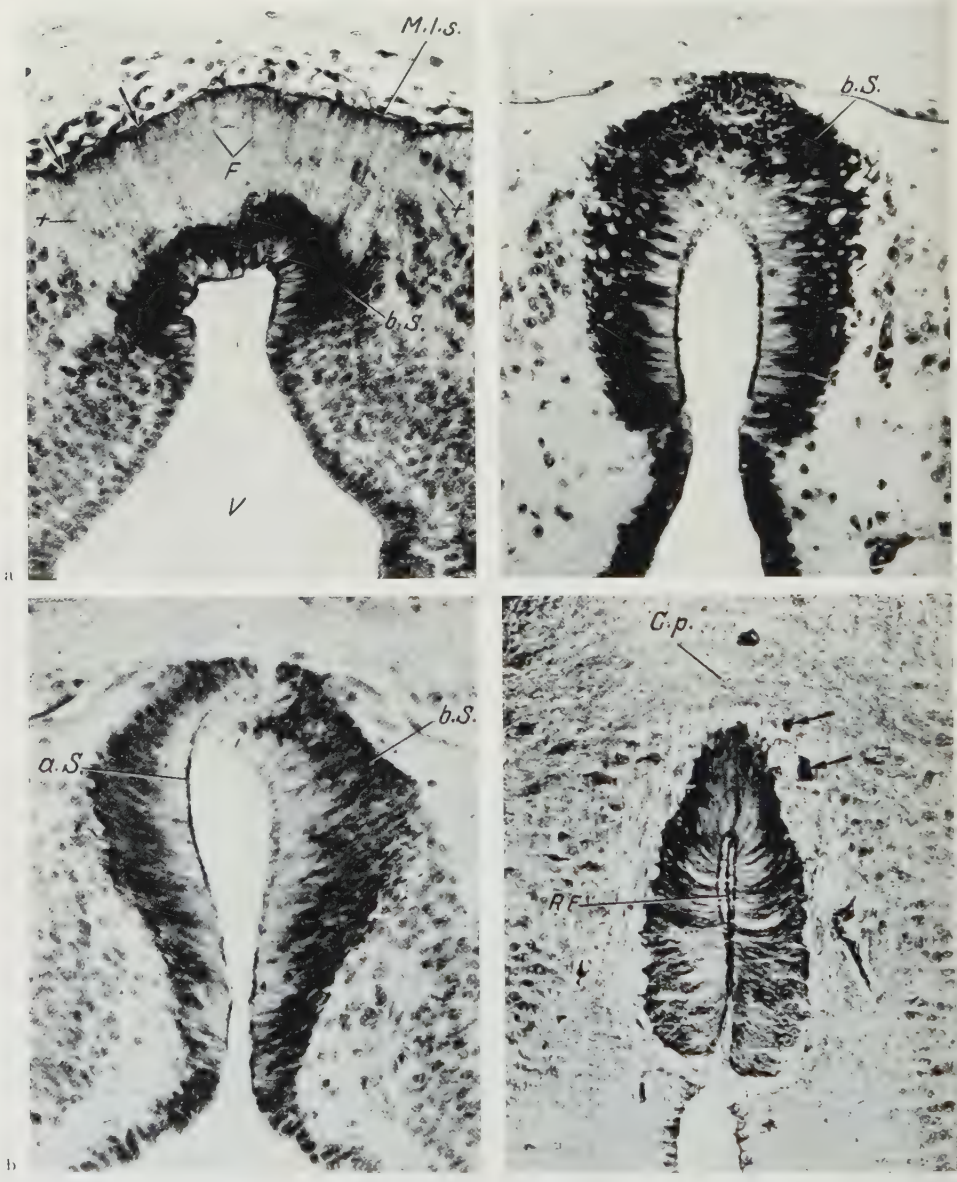


Abb. 13a—d. Subkommissuralorgan der Eidechse *(Chalcides ocellatus)*. Vergleich der Verhältnisse im embryonalen und adulten Gehirn bei gleicher Vergrößerung. Frontalschnitte. a—c Bouin fix., d Susa fix. Chromalaunhämatoxylin-Phloxin. Vergr. 210fach. a 23 mm. *V* Ventrikellichtung (sehr weit); *M.l.s.* Membr. limit. superfic.; *b.S.* basale Sekretmassen (dunkel); + Areal, das durch sekrethaltige Ependymfortsätze (*F*) ein streifiges Aussehen erhält; ↑ sekretreiche Endfüße. b 31 mm. *b.S.* Basales Sekret; *a.S.* apikaler Sekretsaum. c 43 mm. *b.S.* basale Sekretmassen, von Vakuolen durchsetzt. d Geschlechtsreifes Tier. Basale Zellreihe im Vergleich zu den Embryonen sekretarm. *RF* Reissnerscher Faden; *C.p.* Comm. post.; ↑ sekrethaltige hypendymale Gliazellen

Adultes Tier. Das in der Abb. 13d abgebildete Objekt wies ähnlich wie das SKO aller anderen adulten Exemplare ein kleines, niedriges, sekretarmes SKO auf. Die Zellen der ventrikelnahen und der mittleren Lagen hatten das Aussehen hoher zylindrischer Epithelzellen; nur die basalen entsandten ganz zarte, unscheinbare Ausläufer zur Membrana limit. superfic. Das Perikaryon enthielt nur sehr feine Sekretkörnchen, die sich oft an den beiden Polen des Zellkerns zu kleinen kappenartigen Anhäufungen verdichten. Ein deutlicher apikaler Sekretsaum wurde nicht dargestellt. In der basalen Zellreihe fand sich nur wenig Sekret. In den zur äußeren Grenzmembran strebenden Ependymfortsätzen wurden nur gelegentlich elektiv gefärbte Körnchen beobachtet und zwar an einer Stelle ganz dicht unter der Membrana limit. superfic. Die im Hypendym ganz locker verteilten rundkernigen Zellen enthielten keine Sekretkörnchen.

Embryo, 77 mm Länge, kurz vor der Geburt. Das SKO reichte zwar im Vergleich zum erwachsenen Tier noch weit nach kaudal, seine cytologische Differenzierung entsprach aber annähernd dem Erwachsenenzustand. Insbesondere waren die Ependymfortsätze der basalen Zellreihe ähnlich zart und unscheinbar wie beim adulten Tier. Das SKO enthielt mehr Sekret als beim adulten Tier, insbesondere an der Basis des ganzen ependymalen Verbandes. Vereinzelt wurden Sekretkörnchen auch in den zur äußeren Grenzfläche ziehenden Zellausläufern nachgewiesen. Im Ventrikellumen ließ sich ein feiner Reissnerscher Faden anfärben.

Embryo, 43 mm Länge (Abb. 13c). Im Vergleich mit den beiden oben beschriebenen Objekten handelt es sich um ein sehr großes, hohes SKO. Seine basale Zellreihe stach durch Mengen eines homogenen, dunkel gefärbten Sekretes, das von Vakuolen durchsetzt war, hervor. Sekrethaltige Ependymfortsätze wurden nicht beobachtet, dafür aber körnchenhaltige Zellen im Hypendym. Ein apikaler Sekretsaum lag nicht vor, wenn auch an der freien Ventrikeloberfläche kleine Sekretgranula elektiv angefärbt wurden. Das Ventrikellumen enthielt ganz zarte Sekretfäden.

Embryo, 31 mm Länge, zwei Exemplare von verschiedenen Muttertieren (Abb. 13b).

1. Großes, hohes SKO mit basaler Sekretanreicherung und einem deutlichen apikalen Saum. Im Lumen ein sehr zarter Reissnerscher Faden. In den Ependymfortsätzen keine elektiv gefärbten Körnchen.

2. Ganz vereinzelt körnchenhaltige Ependymfortsätze und sekrethaltige Hypendymzellen.

Embryo, 23 mm Länge (Abb. 13a). Das im Vergleich zum ganzen Gehirn erstaunlich große SKO zeigte eine betont basale Sekretlagerung und war sekretreicher als bei den beiden 31 mm langen Embryonen. Die sekretorische Aktivität ließ sich in unverminderter Stärke bis zum kaudalen Ende des Organs verfolgen. Besonders fielen die zahlreichen, dicht gelagerten und starken Fortsätze basaler ependymaler Tanycyten auf. Diese zur Membrana limit. superfic. aufstrebenden Zellausläufer waren sehr deutlich durch Sekretkörnchen gezeichnet. Dadurch erhielt die anliegende dorsale Ventrikelwand eine schleierartige Zeichnung. Im rostralen Teil reichten die basalen Zellen des SKO dicht an die äußere Grenzmembran heran; aber auch weiter kaudal wurden Körnchenansammlungen

unmittelbar an der äußeren Grenzmembran beobachtet. An den Wandstellen mit der bereits relativ starken Comm. post. kamen außerdem noch sekrethaltige Hypendymzellen vor. Die freie Ventrikeloberfläche zeigte einen deutlichen Sekretsaum.

Beurteilung. In dem untersuchten Chalcides-Material war das SKO junger Embryonen sekretreicher und sowohl der Fläche nach, als auch auf das ganze Gehirn bezogen, größer als das SKO adulter Tiere. Bei allen Embryonen wurde eine bevorzugt basale Sekretlagerung beobachtet. Die bei dem 23 mm langen Embryo beobachtete Sekretverteilung über den ganzen Verlauf der ependymalen Zellfortsätze kann nicht mit der Annahme einer einfachen Stapelung erklärt werden (vgl. dazu den Befund von Murakami, Ban und Aiura 1957 bei *Gecko japonicus*). Bei einem 23 mm langen Embryo war das SKO sekretreicher als bei zwei 31 mm langen Embryonen. Die homogenen basalen Sekretmassen, die bei einem 43 mm langen Embryo vorkamen, schienen durch eine Drosselung der basalen Sekretabgabe entstanden zu sein. Das SKO eines 77 mm langen Embryos zeigte bereits einen Übergang zum Erwachsenenzustand, charakterisiert sowohl durch die Abnahme der Epithelhöhe als auch durch den Rückgang der Sekretmenge. Die basalen Ependymfortsätze bilden sich bei *Chalcides* zurück, ohne daß es zur Ausbildung einer funktionstüchtigen hypendymalen Zellformation kommt. Auch die Menge des an der freien Ventrikeloberfläche angehäuften Sekretes nimmt ab. Das SKO des adulten *Chalcides* erscheint im Vergleich zu den embryonalen Verhältnissen rudimentär. Vermutlich ist auch in der Einengung des epithalamischen Teiles des 3. Ventrikels ein Zeichen der Funktionseinschränkung des SKO zu erblicken. In der Entwicklung des *Chalcides*-SKO besteht eine zeitliche Beziehung zwischen der fortschreitenden Rückbildung und der Dickenzunahme der dorsalen Ventrikelwand, die wiederum wesentlich von der Verstärkung der Comm. post. abhängt.

Dem histologischen Bild nach erfüllt das SKO von *Chalcides ocellatus* während des Embryonallebens eine wesentlichere biologische Aufgabe als im adulten Stadium.

V. Aves

a) Gallus gallus

Die sekretorische Aktivität des embryonalen Hühnchen-SKO hat Wingstrand (1953) mit der Chromalaunhämatoxylin-Methode erforscht. Das erste elektiv färbbare Material wurde hier früh, bereits am 6. Bebrütungstag beobachtet. Am 7. Tag war eine Zunahme der färbbaren Substanz zu verzeichnen: am basalen Pol des Zellkerns ließen sich kappenartige Anhäufungen von Granulis nachweisen, an der freien Ventrikeloberfläche ein Körnchensaum. Dieses Bild änderte sich wenig zwischen dem 8. und 15. Bebrütungstag; vielleicht nimmt aber die Sekretmenge bis zum 10. Tag noch etwas zu. Die mit Chromalaunhämatoxylin färbbare Substanz sank gegen Ende der Inkubationsperiode wieder ab. Am 19. Tag und bei frisch geschlüpften Küken wurden nur noch an der freien Ventrikeloberfläche Sekretkörnchen beobachtet. Einen ähnlichen Befund erhob Wingstrand am SKO adulter Vögel *(Columba livia, Sylvia atricapilla)*; ihr SKO war sehr arm an elektiv färbbarer Substanz. Über das Hypendym sei unter Hinweis auf Bauer-Jolk (1919), Kolmer (1921) und Reichold (1942) mitgeteilt, daß es bei Vögeln aus nur wenigen Zellen besteht. Die am Hühnchen-SKO erhobenen Befunde wurden im wesentlichen von Grignon (1956) bestätigt.

An Hand eigenen Materials werden nun die Verhältnisse am SKO eines adulten ♂ *Gallus* beschrieben (Abb. 14).

Verglichen mit dem von WINGSTRAND abgebildeten SKO (Sagittalschnitt) eines frisch geschlüpften Hühnchens ist die Ventrikelwand, die den epiphysennahen Abschnitt des SKO überlagert, auch im adulten Zustand noch auffallend dünn. Dieses Verhalten erscheint bemerkenswert, da weiter kaudal infolge der Ausbildung einer sehr starken Comm. caud. eine erhebliche Zunahme der Wanddicke zu beobachten ist. Nach der Höhe des ependymalen Verbandes und nach der Sekretmenge beurteilt, ist das SKO des adulten *Gallus* funktionstüchtig.

An der freien Ventrikeloberfläche zeigte sich ein mit Chromalaunhämatoxylin färbbarer Körnchensaum. Die stärkste Sekretanhäufung lag aber an der Basis

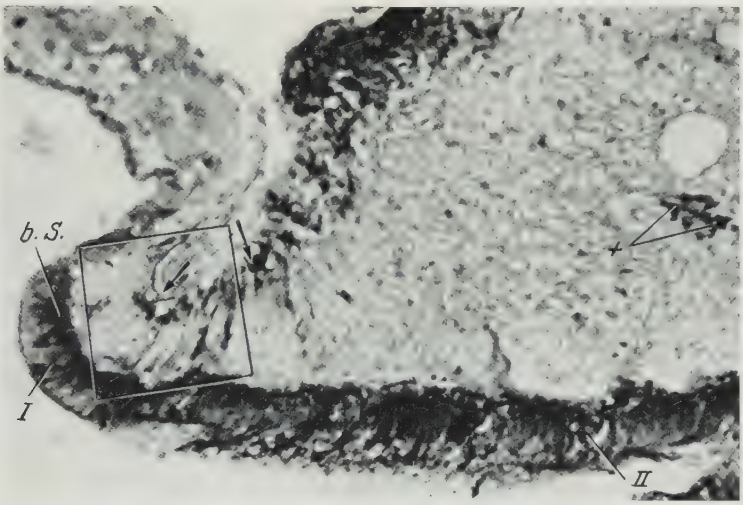


Abb. 14. Subkommissuralorgan eines adulten *Gallus gallus*. Sagittalschnitt. Bouin fix. Chromalaunhämatoxylin-Phloxin. Vergr. 224fach. *I* Dünnwandiger Abschnitt des SKO mit einer starken basalen Sekretanhäufung (*b.S.*). In dem quadratisch begrenzten Bezirk sekrethaltige Stränge, die aus bipolaren Gliazellen bestehen. ↓ Sekret unter der Membr. limit. superfic.; *II* SKO im Bereich des Wulstes der Comm. post.; + sekrethaltige hypendymale Zellen

des SKO vor. Der dünne rostrale Wandabschnitt enthielt mit Chromalaunhämatoxylin elektiv gefärbte Stränge, die sich von der Basis des SKO bis zur äußeren Grenzmembran verfolgen ließen. Diese erwiesen sich als ein Verband sekrethaltiger bipolarer Hypendymzellen (Abb. 15). Mitunter waren die Ausläufer dieser Zellen so lang, daß eine einzige Zelle die ganze Wandhöhe überbrücken konnte. Nicht selten bildeten aber 2 Zellen einen kettenartigen Verband. Das Aussehen dieser Zellen war nicht einheitlich. Ein Teil der mit Sekretkörnchen besetzten bipolaren Elemente fiel durch die besonders zarten Ausläufer auf, die der Zelle ein ausgesprochen spindeliges Aussehen verliehen. Andere bipolare Zellen hatten dagegen ein cytoplasmareicheres Perikaryon und kräftigere Fortsätze. Von Bedeutung sind die Kontakte der Fortsatzenden. Proximal waren eindeutige räumliche Beziehungen zur basalen Sekretanhäufung des SKO vorhanden. Mitunter befand sich zwischen dem aufgetriebenen Fortsatzende und dem basalen Sekret ein vakuolisierter, durch eine dünne Membran begrenzter Bezirk. Es ließ sich aber nicht einwandfrei feststellen, ob diese vakuolisierte Zone zu der basalen Zellreihe des SKO oder zum Fortsatz der bipolaren Hypendymzelle gehört. Von den peripheren Zellausläufern wurden hier an der äußeren

Grenzfläche keine so typischen Endfüße ausgebildet wie etwa bei den Anuren. Zum Teil lag aber ein aufgetriebenes Fortsatzende vor. In einigen Fällen lief eine solche, mit Sekretkörnchen beladene Endformation an einer blasigen Struktur aus, die dorsal von der Membrana limit. superfic. begrenzt wurde und wohl den Gliakammern vergleichbar ist. Außer den mit Sekret gefüllten Endkeulen an der Membrana limit. superfic. kamen direkt unter der Grenzmembran auch noch kleine bipolare Zellen mit kurzen Ausläufern vor, die ebenfalls einen mit Chromalaunhämatoxylin gefärbten Stoff enthielten. Weiter kaudal im Bereich der dicken Ventrikelwand gab es vereinzelte, nach dorsal ragende Zellkegel mit besonders zahlreichen Sekretgranula.

Abb. 15. Subkommissuralorgan eines adulten *Gallus gallus*. Ausschnitt aus dem quadratisch begrenzten Bezirk in der Abb. 14. *b.S* Basale sekretreiche Zellreihe; ↑ sekrethaltige bipolare Gliazellen; *Vk.* Vakuolen; *Glk.* Gliakammer; *Ef.* endfußartige Erweiterung des Zellfortsatzes

Bei einem zweiten ♂ *Gallus* wurden neben spindelförmigen auch noch sternförmige oder geweihartige hypendymale Zellen beobachtet, deren Astwerk durch Sekretkörnchen gezeichnet war.

Beurteilung. Die zwischen dem SKO und der Membrana limit. superfic. eingeschalteten Hypendymzellen sind als sekrethaltige Verbindungsstränge aufzufassen. Das Auftreten der elektiv färbbaren Substanz in solchen, nicht mehr zum epen-

dymalen Verband des SKO gehörenden Elementen kann hier nicht als Speicherung für eine spätere Sekretabgabe in den Ventrikelliquor gedeutet werden.

b) Zonotrichia leucophrys gambelii (Passeriformes)

Adultes Tier. Das SKO der adulten nordamerikanischen Ammer ist wesentlich niedriger und sekretärmer als das SKO von *Gallus* (Abb. 16). Es zeigt kaudal eine angedeutete Zweiteilung. Hier gelang es mit der Paraldehydfuchsin-Methode, geringe Sekretmengen auch an solchen Stellen nachzuweisen, an denen die Chromalaunhämatoxylin-Methode erfolglos geblieben war. Sekrethaltige Ependymfortsätze und hypendymale Gliazellen wurden nicht beobachtet. Eine

differenzierte hypendymale Formation lag überhaupt nicht vor. Im Lumen war es möglich, einen Reissnerschen Faden anzufärben.

Nestling, etwa 8 Tage alt. Im Vergleich mit dem SKO der geschlechtsreifen Ammer war das SKO des untersuchten Jungtieres größer, höher und besser differenziert. Mit der Paraldehydfuchsin-Methode gelang es, elektiv gefärbte Körnchen nicht nur an der Basis des SKO, sondern auch in den Zellausläufern selbst nachzuweisen. Außerdem lagen auch noch sekrethaltige Hypendymzellen vor. Das Ventrikellumen wies einen Reissnerschen Faden auf. Im Vergleich

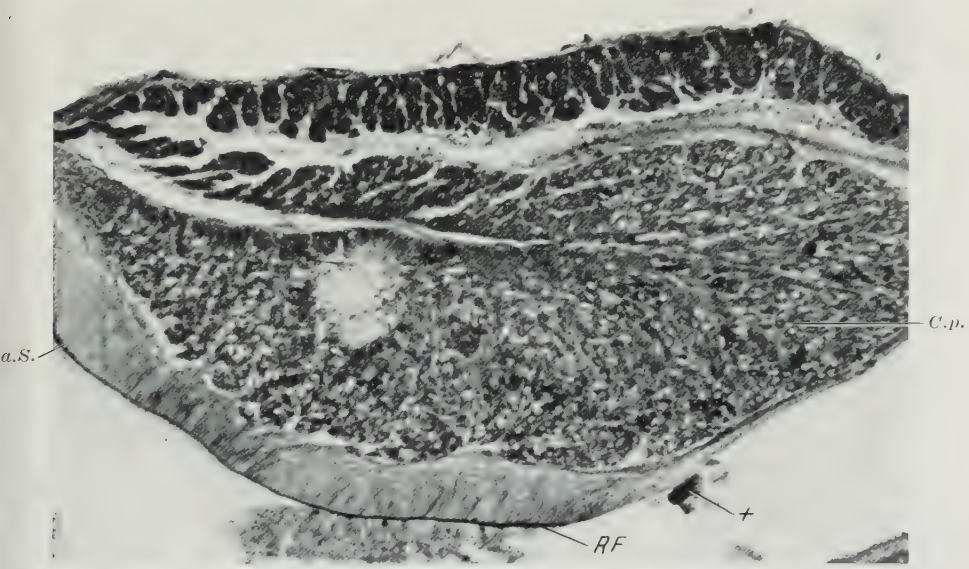


Abb. 16. Subkommissuralorgan von *Zonotrichia leucophrys gambelii*. Sagittalschnitt. Bouin fix., Paraldehydfuchsin-fast green-Orange G. Vergr. 116fach. *C.p.* Comm. post.; *a.S.* apikales Sekret; *RF* Reissnerscher Faden, der der freien Ventrikeloberfläche ganz dicht anliegt; + Verstärkung des Reissnerschen Fadens. An der Basis des SKO kein Sekret. Keine hypendymale Zellformation

zur adulten Ammer war der dem SKO anliegende Abschnitt des 3. Ventrikels erstaunlich weit.

Beurteilung. Das SKO des Ammernestlings erscheint aktiver als das SKO der adulten Ammer. Die Ependymfortsätze sind beim Nestling kräftiger als beim geschlechtsreifen Tier. Nur beim Nestling enthalten sie Sekret in nennenswerten Mengen. Die beim Nestling beobachteten Hypendymzellen sind im Erwachsenenstadium nicht nachweisbar.

VI. Mammalia

1. Insectivora

Erinaceus europaeus L.

Beim Igel soll zumindest im adulten Zustand kein SKO vorkommen (vgl. Bargmann 1943).

In einer sagittalen Paraldehydfuchsin-Serie und einer frontalen Chromalaun-hämatoxylin-Serie habe ich kaudal von der kleinen zapfenförmigen Epiphyse mehrere eigenartige recessusähnliche Ausbuchtungen des Ventrikels beobachtet,

die von einem etwas höheren, aber unregelmäßig gegliederten Ependym ausgekleidet waren. Dieser Ependymabschnitt erinnerte morphologisch in keiner Beziehung an ein typisches SKO und enthielt auch kein elektiv färbbares Sekret. Unter dem Ependym lag ein aus zahlreichen Zellen bestehender, sonst aber wenig organisierter Zellhaufen. In diesen Zellen war ein typisches Subkommissuralsekret nicht sicher nachzuweisen, wenn auch vereinzelte kleine, mit Paraldehydfuchsin gefärbte Körnchen dargestellt wurden. Da bei einem anderen Insektenfresser, dem Maulwurf *(Talpa europaea)* ein zwar kleines und sekretarmes, aber typisches SKO vorhanden ist, liegen beim Igel besondere Verhältnisse vor, die eine Untersuchung des Embryonalzustandes erforderlich machen. Der beim adulten Igel beobachtete Zustand kann aber nicht mit den Verhältnissen beim erwachsenen Menschen (s. S. 599) verglichen werden.

2. Carnivora

a) Felis domestica

Mit der Chromalaunhämatoxylin-Methode wurde bisher nur das SKO erwachsener Katzen untersucht (Bargmann und Schiebler 1952). Der elektive Sekretnachweis sollte nun auch bei Embryonen und neugeborenen Katzen durchgeführt werden. Besondere Aufmerksamkeit war dabei der Herkunft und Differenzierung der hypendymalen Zellformationen zu widmen, wobei von der Paraldehydfuchsin-Methode ein detaillierteres Sekretverteilungsbild zu erwarten war als vom Chromalaunhämatoxylin (vgl. Oksche 1959/60).

Katzenembryo, 12 mm Länge. Die Anlage des SKO (Abb. 17a), die sich kaudal an die schwach ausgebuchtete Epiphysenanlage anschloß, zeichnete sich durch einen von anderen Ependymabschnitten abweichenden Bau aus. Hier fehlte die für das Ependym der benachbarten Wandabschnitte so charakteristische Schicht, die von den aus der Matrixzone des Ependyms ausgewanderten Zellen gebildet wird. Die Ependymanlage des SKO zeigte eine bemerkenswert vorgeschrittene Differenzierung. Die innerste, an der freien Ventrikeloberfläche liegende Ependymreihe enthielt besonders große, epithelähnliche Zellen mit zahlreichen Mitosen. Die Ependymzellen der basalen Zellreihe wiesen dagegen einen auffallend kräftigen Zellfortsatz auf, der an der äußeren Grenzmembran mit einem stempelartigen Endfuß auslief (Abb. 17a, 26IIa). In den Zellfortsätzen konnte kein elektiv färbbares Sekret nachgewiesen werden. An der freien Ventrikeloberfläche ließ sich dagegen ein fast homogener Saum anfärben (Abb. 17a). Ein Reissnerscher Faden wurde nicht beobachtet.

Neugeborene Katze, $^1/_2$ Tag alt. Das hohe, mehrreihige SKO der neugeborenen Katze zeichnete sich ganz besonders durch zahlreiche strangartige Strukturen aus, die seine Basis mit der äußeren Grenzmembran und den in Piatrichtern liegenden Gefäßen (Abb. 17d) verbanden. Die Molybdänhämatoxylin-Methode von Held zeigte deutlich, daß diese Stränge nicht aus Gliafasern, sondern aus zelligen Elementen bestehen. Im dünnwandigen rostralen Teil des SKO wurden die Stränge noch von einzelnen oder in Bündeln zusammengefaßten Fortsätzen basaler Ependymzellen gebildet (Abb. 26IIb). Weiter kaudal dagegen (Abb. 17b), wo die Wanddicke durch die Ausbildung der Comm. post. bereits eine beachtliche Dickenzunahme erfahren hat, bestanden sie aus kettenartig aneinandergereihten bipolaren oder spindeligen Zellen. Der Zusammenhang zwischen der

Wanddicke und der Anzahl der Kettenglieder wird am deutlichsten durch die Abb. 26 II b und c veranschaulicht. An der Basis des SKO kamen nach dorsal vorspringende Zellkegel (Abb. 17 b) vor, durch die eine Annäherung des sekretorischen Parenchyms an die äußere Grenzmembran erzielt wurde. Diese Zellverbände zeigten eine deutliche Loslösung vom ependymalen Zellverband. Der Verselbständigung geht eine Auflockerung der Zellformation an der Kegelbasis voraus, die durch Einwanderung von Gefäßen besonders gekennzeichnet ist. Zwischen einem lückenlosen Zusammenhang (Abb. 26 II c) und einer vollendeten Trennung in eine ependymale und hypendymale Zellformation (Abb. 17 b, *3*) fanden sich Übergänge (Abb. 17 b, *2*). Die vom Ependymverband weitgehend oder ganz abgetrennten Zellinseln wiesen in diffuser Verteilung schon höher differenzierte multipolare Elemente auf (Abb. 17 d), wie sie beim geschlechtsreifen Tier im Vordergrund stehen. Diese Zellen zeigen keine Merkmale von Neuronen; sie fügen sich in die Formenreihe der Glia ein.

Die Zellfortsätze der basalen Ependymzellen und der bipolaren und spindeligen Elemente enthielten mit Paraldehydfuchsin elektiv färbbare Sekretkörnchen, nicht selten in der Nähe der Membr. limit. gliae superfic. und perivasc. (Abb. 17 d), an der sie mit einem stempelartigen Endfuß auslaufen. Die multipolaren, locker gefügten Hypendymzellen enthielten elektiv färbbares Sekretmaterial im Perikaryon wie in den Zellausläufern. Im Gegensatz zur basalen Zellreihe und den mehr oder minder selbständigen hypendymalen Formationen fand sich an der freien Ventrikeloberfläche des SKO nur wenig Sekret. Das SKO eines 3 Tage alten Kätzchens zeigte das gleiche Bild, wie es für den 1. Lebenstag beschrieben wurde.

Adulte Katze. Der Vergleich der Abb. 17 b und c zeigt, daß bei der Katze im Erwachsenenzustand ein niedrigerer, ependymaler Zellverband des SKO vorliegt als beim neugeborenen Tier. Die sekretorische Aktivität des ependymalen Zellverbandes erscheint aber nicht eingeschränkt. Hypendymale bipolare Zellen wurden nur im dünnwandigen rostralen Bereich des SKO beobachtet. Weiter kaudal enthielt das Hypendym locker angeordnete, spindelige oder abgerundete, mehrere feine spießartige Fortsätze aufweisende Zellen ohne Nissl-Substanz. Ein lockeres Faserwerk trennte sie vom ependymalen Verband des SKO (Abb. 26 II d). Das Band der hypendymalen Zellformation erschien im ganzen schmal, im Vergleich zum neugeborenen Tier eingeschränkt. Der positive Sekretnachweis und die gute Gefäßversorgung sprachen aber dafür, daß die erhalten gebliebenen hypendymalen Zellgruppen voll funktionstüchtig sind.

Beurteilung. Die morphologische Eigenart und die sekretorische Leistung der Zellen des SKO sind bei der Katze schon im frühen Embryonalstadium angedeutet. Im voll ausgeprägten Katzen-SKO kommen große Sekretmengen sowohl an der freien Ventrikeloberfläche, als auch an der Basis des SKO vor, wo besondere hypendymale Zellverbände ausgebildet sind, die Gefäßkontakte herstellen.

Die primitive Form des Hypendyms findet sich in Ketten sekrethaltiger bipolarer und spindeliger Gliazellen, die nach und nach den direkten Fortsatzkontakt der basalen Ependymzellen mit den gliösen Grenzmembranen ersetzen. Mit der Zunahme der Wanddicke werden diese Zellketten wiederum von diffus verteilten multipolaren Zellen abgelöst, die Gliacharakter haben und Gefäß-

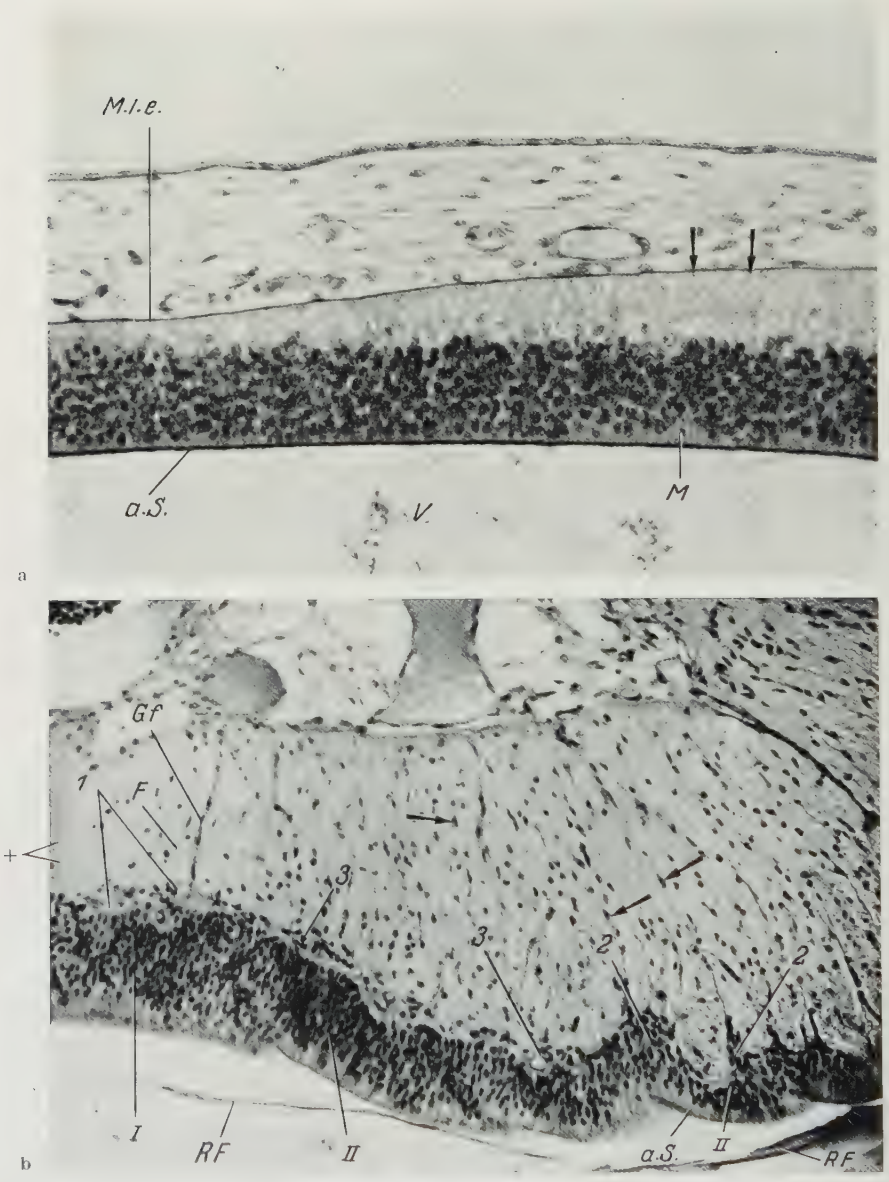
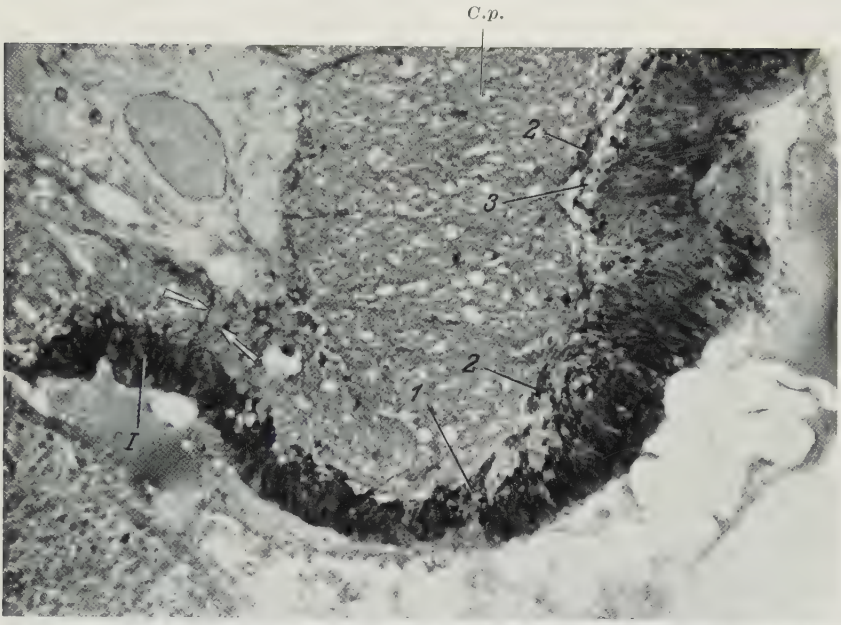
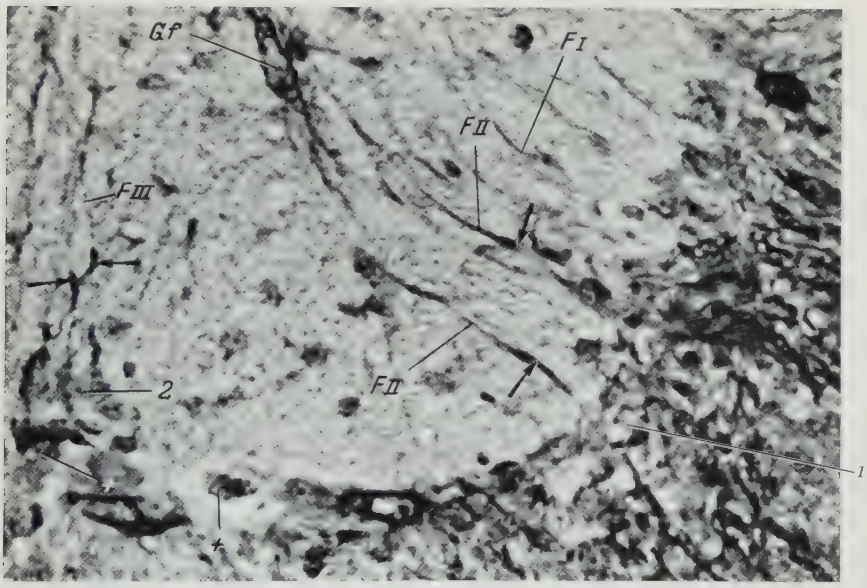


Abb. 17a—d. Subkommissuralorgan der Katze *(Felis domestica)*. a) Embryo, 12 mm Scheitel-Steiß-Länge. Sagittalschnitt. Kaformacet. Chromalaunhämatoxylin-Phloxin. Vergr. 224fach. *V* Ventrikel; *M.l.e.* äußere Grenzmembran; *a.S.* apikaler Sekretsaum; *M* Mitose; ↑ stempelartige Endfüße der ependymalen Zellausläufer. b) Neugeborenes Tier, 1. Lebenstag. Sagittalschnitt. Bouin. Chromalaunhämatoxylin-Phloxin. Vergr. 140fach. Zunahme der Wanddicke in rostro-kaudaler Richtung. *I* Dünnwandiger Abschnitt. Basale Zellfortsätze (+) erreichen die äußere Grenzmembran. Nur vereinzelte hypendymale Zellen im lockeren Zusammenhang mit dem ependymalen Zellverband (*1*), *F* Zellfortsätze der hypendymalen Zellen; *Gf.* Gefäßverbindung des SKO mit meningealen Gefäßen. *II* Dickwandiger Abschnitt. Nach dorsal vorspringende ependymale (*2*) und hypendymale (*3*) Zellkegel. ↑ Zellketten zur äußeren Grenzmembran; *a.S.* apikaler Sekretsaum; *RF* Reissnerscher Faden. c) Adultes Tier. Sagittalschnitt. Bouin. Chromalaunhämatoxylin-Phloxin. Vergr. 140fach. *C.p.* Comm. post. Die zur äußeren Grenzmembran aufsteigenden Zellketten sind nicht mehr nach-



c



d

weisbar. Im dünnwandigen Teil (*I*) sekrethaltige bipolare Gliazellen (↑). *1* Basaler, aus dem ependymalen Zellverband entstandener Zellkegel; *2* hypendymale Inseln; *3* lockere Faserschicht. d) Neugeborenes Tier. Dünnwandiger Abschnitt des SKO (Objekt wie in Abb. 17 b). Sagittalschnitt. Bouin. Paraldehydfuchsin-fast green-Orange G. Vergr. 560fach. Zellfortsätze: *F I* von der basalen Zellreihe des ependymalen Verbandes (*1*) zur äußeren Grenzmembran; *F II* zu einem Gefäßtrichter (*Gf* Gefäß, ↑ Sekreteinlagerung im Zellfortsatz); *F III* von einem lockeren hypendymalen Zellverband (*2*) zur äußeren Grenzmembran; + sekrethaltige hypendymale Zellen; ↑ Sekret im Zellfortsatz

beziehungen aufweisen. Die polare Ausrichtung des SKO 1. auf den Ventrikel und 2. auf die Blutgefäße wird also auch bei der adulten Katze nicht aufgegeben.

b) Canis familiaris

Die sekretorische Aktivität des Hunde-SKO wurde mit der Chromalaunhämatoxylin-Methode bereits von Bargmann und Schiebler (1952), mit der Paraldehydfuchsin-Methode von Talanti (1958) untersucht. Bei der Anfertigung eigener Präparate wurde die Paraldehydfuchsin-Färbung bevorzugt (vgl. Oksche 1959/60). Die letztere weist Sekret auch an Stellen nach, wo mit der Chromalaunhämatoxylin-Methode keine elektive Färbung gelingt. Anders als Bargmann und Schiebler habe ich die sagittale Schnittrichtung bevorzugt, um den Vergleich dünnwandiger und dickwandiger Abschnitte in einem und demselben Schnitt zu haben. Das SKO des Hundes (Abb. 18a) (vgl. Bargmann und Schiebler) weist rostral eine eigenartige, tief in das Ventrikellumen ragende Falte auf, auf die weiter kaudal ein tiefer Einschnitt folgt. Erst nach einer Übergangszone beginnt der dicke Wulst der Comm. post. Im kaudalen Bereich ist das SKO zum Teil zerklüftet, indem zottenartige Bildungen in das Lumen vorragen.

Adulter Hund. Dieses SKO enthielt zahlreiche periphere Zellstraßen (Abb. 18a–c, 19a). Die Beschreibung seines dünnwandigen Abschnittes schließt auch die auf die Querfalte folgende Ependymbucht ein. Die verschieden breiten, zelligen Verbindungsstraßen des SKO mit der äußeren Grenzmembran (Abb. 18a, b) bestanden zum Teil aus ähnlichen cytoplasmareichen epithelialen Elementen wie die basale Zellreihe und enthielten beträchtliche Mengen elektiv färbbarer Substanz. Die Zellen liefen an der äußeren Grenzmembran mit einer fußartigen Verbreiterung aus, so daß mit Körnchen beladene Strukturen direkt unter der Membrana limit. superfic. lagen. Gelegentlich wurden auch kammerartig vakuolisierte Kontaktstellen beobachtet. Beim adulten Tier ist die fingerförmige Einstülpung, die der in den Ventrikel ragenden Falte außen entspricht und bei neugeborenen Hunden noch recht deutlich zu sehen ist, bis auf einen ganz engen, mit gefäßhaltigem Piabindegewebe gefüllten Zwischenspalt geschwunden. An dieser Stelle trafen sekrethaltige Zellstraßen von rostral und kaudal auf die äußere Grenzmembran. Diese zum Teil recht breiten und dicht nebeneinanderliegenden Zellstraßen führten zu einer erheblichen Sekretakkumulation an der äußeren Grenzmembran. Die breitesten Zellstränge wurden an dem nach außen gerichteten Scheitelpunkt der Ependymbucht beobachtet (Abb. 18a, b). Hier waren die sekrethaltigen Zellen übereinander palisadenartig angeordnet. Innerhalb von diesen zum Teil langen und schmalen Zellen ließen sich Sekretkörnchen in kettenartiger Anordnung nachweisen. Durch das Nebeneinander mehrerer solcher Zellreihen entstand das Bild parallel verlaufender Körnchenketten. Nicht alle Zellstraßen zeigten einen soliden epithelialen Bau. Es kamen auch Ketten bipolarer Zellen vor, die die gleiche Verlaufsrichtung hatten wie die breiten Zellstraßen und den Verbindungssträngen bei neugeborenen Katzen entsprachen.

Abb. 18a—c. Subkommissuralorgan des Hundes *(Canis familiaris)*. Adultes Tier. Sagittalschnitte. Bouin fix., Paraldehydfuchsin-fast green-Orange G. a) Übersicht. *3.V* 3. Ventrikel; *AS* Aquaeductus Sylvii; *C.h.* Comm. habenularum; *I* rostraler dünnwandiger Teil; *II* Übergangszone; *III* vom Wulst der Comm. post. (*C.p.*) bedeckter Teil des SKO; *1* Querfalte; *2* Zwischenspalt mit Piabindegewebe und Gefäßen; *3* Ventrikelbucht; *4* Scheitelpunkt der Bucht; ↑ Zellstränge und Zellstraßen zur äußeren Grenzmembran (*M.l.gl.s.*); *5* zerklüfteter Abschnitt des SKO. Vergr. 45fach. b) Scheitelpunkt der Bucht bei stärkerer Vergrößerung. *1* Zwischenspalt der Querfalte mit Piabindegewebe und Gefäßen (*Gf*); *V* Ventrikellichtung; *a.S.* apikaler Sekretsaum; *2* vorspringender Zellkegel des ependymalen Verbandes; *3* breite Zellstraßen mit epithelialen Zellen (Sekret dunkel); *4* Ketten bipolarer Gliazellen (+ sekretreiche Stellen); ↑ kammerartige vakuolisierte Zone unter der äußeren Grenzmembran (*M.l.gl.s.*); *5* vorspringende, locker gebaute hypendymale Zellformation mit Verbindungsstrang (*6*) (bei ↑ dunkle Sekretschollen und -massen). Vergr. 112fach. c) Verbindungsstränge im Bereich des Kommissurenwulstes. *V* Ventrikellichtung; *a.S.* apikaler Sekretsaum; *C.p.* Comm. post.; *1* Einbuchtung des ependymalen Verbandes; ↑ Abgang der Verbindungsstränge (Sekret dunkel); *2* Abzweigung eines Verbindungsstranges (bipolare sekrethaltige Zellen); *3* Zellinsel im Verbindungsstrang und Abgang eines Seitenastes (*4*); *5* Gefäßtrichter: + Sekreteinlagerung in Gefäßnähe. Vergr. 112fach

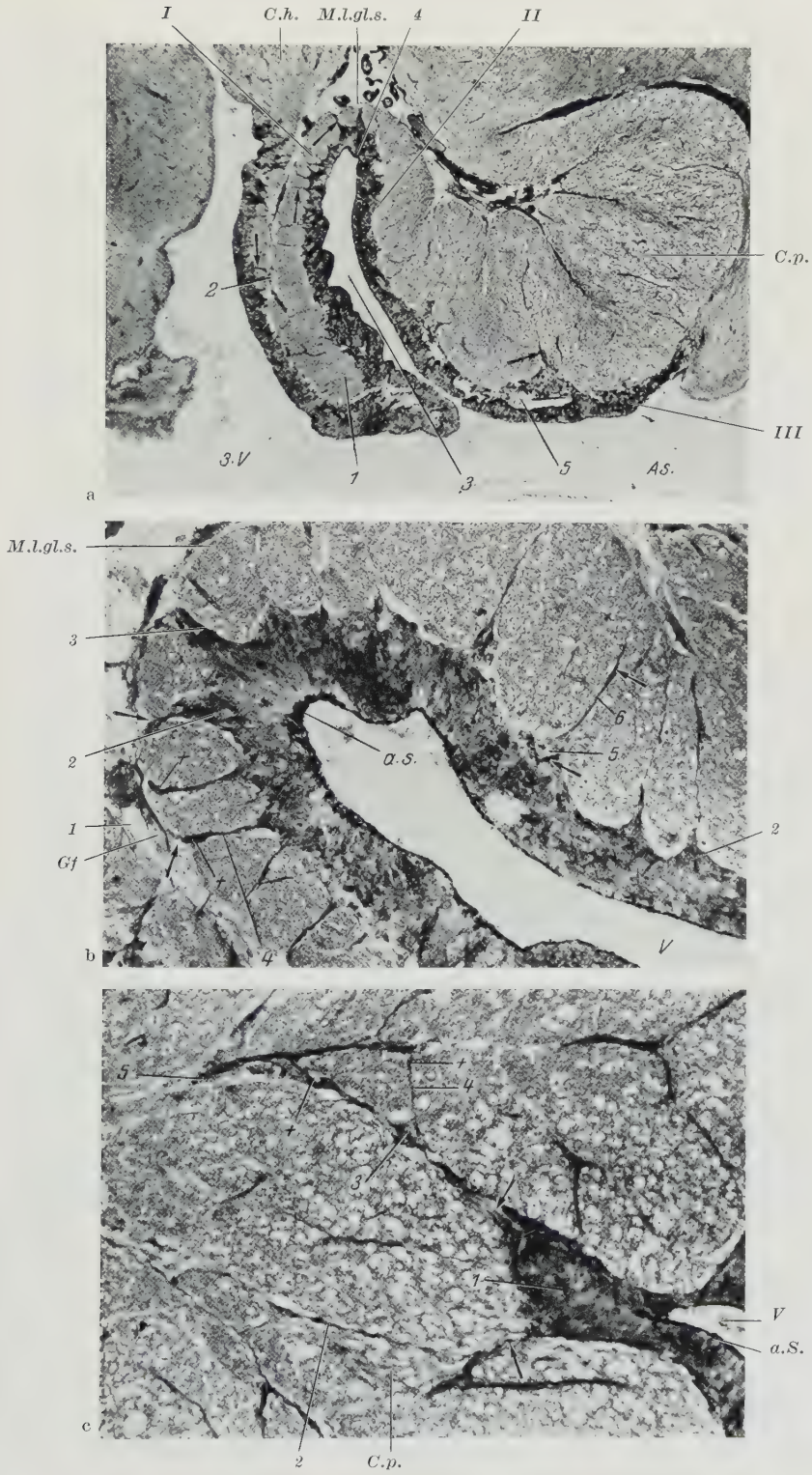

I
C.h.
M.l.gl.s.
4
II
C.p.
2
III
3.V
1
3
5
AS.
a
M.l.gl.s.
3
2
a.s.
6
5
1
Gf
2
4
V
b
5
4
3
1
V
a.S.
c
2
C.p.

Abb. 18

Im Bereich der Ependymfalte und der Einbuchtung gab es außer einigen basal gelegenen, locker gefügten Zellen noch keine regelrechte hypendymale Zellformation. Diese trat in voller Ausprägung erst in der Übergangszone zum dickwandigen Bereich in Erscheinung. Der hypendymale Zellverband war aufgelockert und reich an elektiv färbbaren Strukturen mit einem klumpigen oder sternförmigen Umriß. Gelegentlich entstand der Eindruck, als ob hier mehrere zu einem Verband zusammengefügte Hypendymzellen ihr Produkt in einen Zwischenraum oder in ein Lumen abgesondert hätten. Aber auch intrazelluläre Sekretkörnchen waren deutlich sichtbar. An der starken Füllung des Perikaryons und des Astwerks ließ sich der Zelltyp gut erkennen. Es wurden bipolare, geweihartige, sternförmige und abgerundete Zellen beobachtet, die oft enge Gefäßbeziehungen aufwiesen (Abb. 19b). Das Hypendym des Hunde-SKO besteht also aus recht polymorphen Zellelementen (Abb. 26III c, d). Die hypendymalen Zellformationen hingen stellenweise recht eng mit der basalen Zellage des ependymalen Verbandes zusammen (Abb. 26III b), woraus ihre Herkunft aus einem kegelartig vorgestülpten basalen Zellhügel des ependymalen Verbandes ersichtlich war.

Trotz der sehr starken Ausbildung der Comm. post. war am Hunde-SKO deutlich zu erkennen, daß die peripheren Verbindungen nicht aufgegeben werden. So wurden einerseits die hypendymalen Zellformationen verstärkt, andererseits drangen tiefe, vom Epithel des SKO ausgekleidete Buchten in das Massiv der Comm. post. hinein. In der Tiefe solcher Buchten bildeten die hypendymalen Zellen Verbindungsstraßen, die, nach Überbrückung weiter Strecken, entweder die äußere Grenzmembran oder ein im Gefäßtrichter liegendes Gefäß erreichten (Abb. 18c). Diese Zellstraßen zeigten einen eigentümlichen Bau. Sie bestanden aus spindeligen bipolaren Zellen, die nebeneinander in Bündeln und hintereinander in kettenartigen Formationen geordnet waren. Hier und da erweiterte sich eine solche Straße zu einem zellreichen, dreieckigen oder polygonalen Feld, das epithelähnliche Zellen und besonders intensiv gefärbte Sekretschollen enthielt. Die Zellen dieser Formationen wurden anschließend wieder durch peripherwärts gerichtete spindelige Zellketten abgelöst, deren letztes Glied an der Membrana limit. superfic. auslief. Der ganze Strang enthielt auffallend viel Sekret. Elektiv gefärbte Granula wurden auch in den endfußähnlichen Auftreibungen direkt unter der äußeren Grenzmembran nachgewiesen (Abb. 18b, 19a).

An den Zellapices konnte an manchen Stellen ein breiter Körnchensaum dargestellt werden. Der Sekretreichtum der apikalen Zellreihe zeigte größere regionale Unterschiede. Im kaudalen Bereich des SKO enthielt der Ventrikel einen starken Reissnerschen Faden.

Bei einem zweiten adulten Hund wurde die gleiche Organisation des SKO beobachtet. Nur die breiten peripheren Verbindungsstraßen kamen seltener vor. Im ganzen mangelte es aber auch hier nicht an peripheren Verknüpfungen des SKO-Parenchyms, das cytologisch gut differenziert erschien und viel Sekret enthielt.

Junger Hund. 12 Tage alt. Im Vergleich zum adulten Tier waren die Zellen des ependymalen SKO weniger cytoplasmareich und undeutlicher begrenzt; das Bild erinnerte mehr an ein noch nicht ganz ausdifferenziertes Ependym als an ein ausgeprägtes ependymales Epithel. Am ventrikelnahen Pol war die Menge

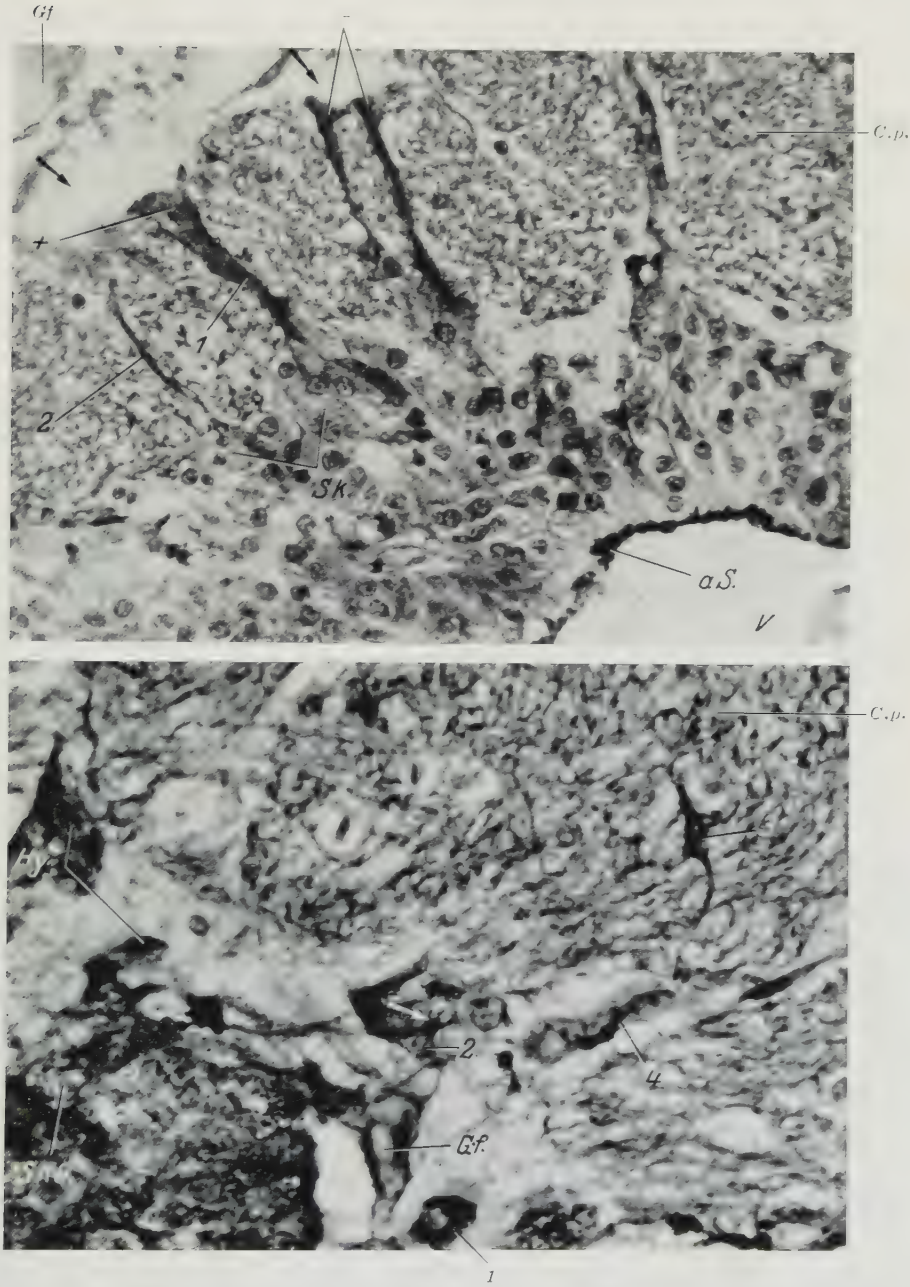


Abb. 19a u. b. Subkommissuralorgan des Hundes. (Objekt wie in Abb. 12.) a Rostraler dünnwandiger Teil mit Verbindungssträngen. Sagittalschnitt. Bouin fix. Chromalaunhämatoxylin-Phloxin. Vergr. 403fach. *V* Ventrikellichtung; *aS.* apikaler Sekretsaum; *Sk.* intrazelluläre Sekretkörnchen; *1* breite Verbindungsstränge (Sekret dunkel) mit fußartigen Endformationen (+); ↑ kammerartige Bildungen; *Gf* Gefäß in der Pia mater; *2* zarter Verbindungsstrang. b Hypendymzellen aus der Übergangszone (vgl. Abb. 18a *II*). Sagittalschnitt. Bouin fix. Paraldehydfuchsin-fast green-Orange G. Vergr. 560fach. SKO = Basis des ependymalen Zellverbandes mit dunklen Sekretkörnchen; *Hy.* Hypendym; *C.p.* Comm. post.; *Gf.* Gefäß. Beispiele sekretreicher Hypendymzellen: *1* Rundzellen; *2* multipolare Zelle mit geweihartigen Ausläufern (↑); *3* bipolare Zelle; *4* sekrethaltige spindelige Hypendymzelle

der feinen Sekretkörnchen geringer als bei den untersuchten adulten Objekten. Die basale Zellreihe stach durch ihren besonders intensiven elektiven Farbton hervor. Zahlreiche Zellstränge strebten zur äußeren Grenzmembran. Am Scheitelpunkt der tiefen Ependymbucht, die infolge der hier sehr dünnen dorsalen Wandschicht dicht an der äußeren Grenzmembran lag, ließen sich direkte basale Ausläufer des ependymalen Zellverbandes zur äußeren Grenzmembran verfolgen. Das Hypendym des rostralen Abschnittes bestand aus netzartig gefügten Zellen, die mit Paraldehydfuchsin intensiv gefärbte Schollen enthielten. Erst weiter kaudal, wo die Wand durch die Comm. post. verdickt wird, traten die an einen epithelialen Verband erinnernden hypendymalen Formationen in Erscheinung. Hier wurde die Verbindung mit der Membrana limit. superfic. sowohl durch basale Ependymfortsätze, als auch durch einzelne bipolare Zellen hergestellt, die erst weiter kaudal, nach Zunahme der Wanddicke, durch Ketten bipolarer Zellen abgelöst wurden. Die Ausläufer dieser Zellen enthielten Sekret. Zellketten strebten durch die Comm. post. auch zu den Gefäßen. Die breiten epithelialen Verbindungsstraßen des adulten SKO wurden vermißt.

Junger Hund, etwa $3^1/_2$ Wochen alt (aus dem gleichen Wurf wie das vorangegangene Jungtier). Die Comm. post. zeigte im Vergleich zu dem 12 Tage alten Tier keine wesentliche Dickenzunahme. Die peripheren Verbindungsstränge enthielten mehr und cytoplasmareichere Zellen. Das Hypendym schien ebenfalls zellreicher und von dem ependymalen Verband deutlicher abgesetzt zu sein.

Beurteilung. Der Vergleich des SKO neugeborener und adulter Hunde ergab keinen Anhaltspunkt für eine regressive Entwicklung. Die Menge des histologisch nachweisbaren Sekretes nahm im Gegenteil in der Ontogenese zu; die peripheren Zellstraßen und die hypendymalen Zellverbände wurden weiter differenziert, die letzteren von der ependymalen Formation verselbständigt. Für die funktionelle Bedeutung der bis zur Membrana limit. superfic. oder zu den Gefäßen (vgl. Talanti 1958) aufsteigenden zelligen Verbindungen spricht die Beobachtung, daß sie von Sekretkörnchen ausgefüllt waren. Am SKO des Hundes konnte man in der Ontogenese bemerken, daß die peripheren gliösen Kontakte nicht aufgegeben werden. Die allmähliche Dickenzunahme der Ventrikelwand, die in rostrokaudaler Richtung durch die Comm. post. bedingt ist, führte schon beim Jungtier zur Ablösung der Fortsätze ependymaler Tanycyten und einzelner bipolarer Gliazellen durch Zellketten. Im kaudalen Abschnitt des adulten Hunde-SKO waren, der Wanddicke entsprechend, sehr lange Ketten notwendig. In der Ontogenese blieben die Verbindungen des SKO mit der äußeren Grenzmembran nicht nur erhalten, sondern sie wurden zum Teil sogar vervollkommnet.

3. Ungulata

Bos taurus

Die Entwicklung des SKO von *Bos taurus* wurde ausführlich von Turkewitsch (1936) unter Hinweis auf die eigenartige sehr starke Ausbildung der hypendymalen Zellformationen beschrieben. Über den Nachweis eines elektiv färbbaren Sekretes im SKO des Rindes berichteten Talanti (1958, 1959) und Olsson (1958a). Sekretorisch aktiv sind beim *Rind* sowohl die subkommissuralen Ependymzellen als auch das Hypendym. Nach Talanti (1958) besteht das Hypendym 1. aus einem retikulären Zellverband, 2. aus epithelialen Schläuchen, die eine Verbindung mit der freien Ventrikeloberfläche haben. Die Querschnitte dieser Schläuche erscheinen in Form von Rosetten (vgl. Olsson 1958a, b). Ob nun die an der

Ventrikeloberfläche ausmündenden hypendymalen Schläuche überwiegen oder blinde Gänge und geschlossene follikelähnliche Formationen häufiger sind, kann meines Erachtens nur durch genaue Rekonstruktion solcher Bezirke entschieden werden. In dem retikulären Hypendymverband unterscheidet Talanti (1958) zwischen Zellen vom Typ der Makroglia und Mikroglia. Diese Einteilung wird allerdings nur auf Grund der Kernform und des Cytoplasmareichtums getroffen. Die Wandzellen der hypendymalen Schläuche sind sekretorisch wesentlich aktiver als die Zellen des retikulären Verbandes (Talanti 1958). Den Hypendymschläuchen des Rindes vergleichbare Zellformationen kommen nach Talanti und Kivalo (1960) auch bei anderen Wiederkäuern *(Schaf, Ziege, Lama, Elch)* vor. Sie sind aber nicht für alle Huftiere charakteristisch; so fehlen sie bei *Pferd* und *Schwein*. Talanti (1958, 1959) betont die engen Beziehungen der sekretorischen Hypendymzellen zu den Gefäßen.

Obwohl das SKO des *Rindes* bereits eingehend mit neueren histologischen Methoden untersucht worden ist, erscheint es angebracht, dieses Objekt nochmals zu beleuchten.

Aus zwei eigenen lückenlosen Serien (ein adultes Tier, ein 4—6 Wochen altes Kalb), die mit Chromalaunhämatoxylin gefärbt wurden, können Befunde mitgeteilt werden, die im Zusammenhang mit der Frage der peripheren Verknüpfungen des SKO von Bedeutung erscheinen.

Adultes Tier. Sekrethaltige Rosetten kamen nicht nur in den an der Basis des ependymalen SKO ausgebreiteten hypendymalen Zellinseln vor, sondern auch zwischen den Faserbündeln der Comm. post., ja sogar in der Nähe der äußeren Grenzmembran. Sie waren am häufigsten in dem rostralen, dünnwandigen Organbereich. Mehrere bzw. zahlreiche Rosetten und lumenfreie Zellinseln lagen hier so übereinander, daß der Eindruck eines in Fragmente unterteilten Pfeilers entstand. Die unterste Rosette hing oft noch mit dem hypendymalen Hauptverband zusammen, die äußerste lag nicht selten dicht unter der äußeren Grenzmembran. Diese von Gefäßen begleiteten Zellkolonnen wurden nicht selten durch epitheliale Querbrücken in horizontaler Richtung untereinander verbunden. An vielen Stellen war es deutlich sichtbar, daß diese Anordnungen sezernierender Parenchymzellen aus den in der Entwicklung vorhandenen Ependymsträngen hervorgegangen sind. Auch noch weiter kaudal, wo die Comm. post. sehr stark wird, konnte das ehemalige Bauprinzip unschwer erkannt werden. Zwischen zwei räumlich getrennten Rosetten fanden sich an Stelle der zugrunde gegangenen Zellbrücken Gliafaserbündel, die oft von einem Gefäß begleitet wurden und die Fasermassen der Comm. post. zum Teil septenartig unterteilten. Manche Rosetten hatten sich sehr weit von der Hauptformation des Hypendyms entfernt. Sie wurden vereinzelt, mit Sekret gefüllt, auch noch im Bereich des größten Durchmessers der Commissur, direkt unter der äußeren Grenzmembran angetroffen.

Jungtier. Zwischen dem Jungtier und dem adulten Rind bestand kein allzu wesentlicher Unterschied im Bauplan des SKO, wenn auch die Dicke der Comm. post. verschieden war. Die basale ependymale Zellage enthielt in beiden Fällen kein Sekret. Die hypendymalen Zellinseln waren beim Kalb genauso stark ausgebildet wie beim erwachsenen Rind, typische sekretgefüllte Rosetten jedoch weniger zahlreich. Nur die zur äußeren Grenzmembran aufstrebenden Zellkolonnen waren beim Kalb zahlreicher und dichter gelagert als beim Rind. Einfache, aus bipolaren Gliazellen bestehende Ketten wurden bei dem untersuchten Jungtier nicht angetroffen.

Beurteilung. Im Vergleich zu anderen Säugern liegt am SKO von *Bos taurus* nur ein Sonderfall der Differenzierung der peripheren Verbindungsstraßen vor.

Sie sind in schlauch-, rosetten- und inselartige Fragmente (vgl. Abb. 26IVc) umdifferenziert, die aber die ursprüngliche Verbindung mit den Gefäßen aufrechterhalten haben. Mit der Dickenzunahme der Ventrikelwand nimmt in kaudaler Richtung die Anzahl der außerhalb des hypendymalen Hauptverbandes liegenden Zellgruppen ab.

4. Rodentia

a) Mus musculus

Eine mit Chromalaunhämatoxylin färbbare Substanz wurde im SKO adulter Mäuse von Wislocki und Leduc (1952) nachgewiesen.

Eigene Sagittalserien von zwei verschieden alten Mäuseembryonen, die mit Chromalaunhämatoxylin gefärbt wurden, sollen im Vergleich zu einem geschlechtsreifen Tier der Erfassung der sekretorischen Aktivität des SKO während des Embryonallebens dienen.

Embryo, 12 mm (Scheitel-Steiß) Länge. Auf die hohle, fingerförmig nach dorsokaudal vorgestülpte Epiphysenanlage folgte ein sehr hohes SKO (Abb. 20a), in dem paramedian 6—10 Kernreihen gezählt wurden. Die an den Ventrikel grenzende Zellage enthielt zahlreiche Mitosen. Von der basalen Zellreihe ließen sich zahlreiche Stränge bis zur äußeren Grenzmembran verfolgen; paramedian waren sie zahlreicher und stärker ausgebildet als median. In dem rostralen, dünnwandigen Drittel des SKO handelte es sich dabei um einfache Ependymausläufer basal gelegener Zellen, in deren Verlauf mit beginnender Verdickung der Ventrikelwand hier und da auch noch bipolare Zellen vom Spongioblastencharakter eingeschaltet waren. Im Bereich der kaudalen Zweidrittel des SKO fielen zahlreiche nach dorsal gerichtete Zellstraßen auf. Sie endigten an der Grenze zum äußeren Drittel des Wandumfangs entweder stumpf oder durch Abgabe von plumpen, astartigen cytoplasmatischen Ausläufern, wobei von der äußeren Zellreihe Ependymfortsätze zur äußeren Grenzmembran entsandt wurden. Zwischen den breiten Zellstämmen konnten auch noch aus gebündelten Ependymfortsätzen bestehende Stränge beobachtet werden, die direkt aus dem ependymalen Zellverband stammten und in deren Verlauf nicht selten bipolare, spindelige Zellen eingeschaltet waren. Beziehungen zu den in Piatrichtern liegenden Gefäßen wurden sowohl von einzelnen Ausläufern der dicken Stämme als auch von den in Bündeln zusammengefaßten Zellfortsätzen aufgenommen. Nur die freie Ventrikeloberfläche des SKO war gekennzeichnet durch einen elektiv gefärbten Körnchensaum, zeigte aber keinen Reissnerschen Faden. Im Perikaryon der Zellen wurden sowohl Granula, als auch die diffuse spezifische Anfärbung des Cytoplasmas vermißt. Auch die Ependymfortsätze enthielten kein mit Chromalaunhämatoxylin färbbares Material.

Embryo, 25 mm (Scheitel-Steiß) Länge. Im Vergleich zu dem jüngeren Embryo war nur der apikale Sekretsaum stärker gezeichnet. An Stelle der breiten Zellstraßen dominierten die feineren Fortsatzbündel; die noch vorhandenen breiten Zellstraßen schienen weniger reich an Zellkernen.

Adulte Maus (Abb. 20b). Außer der Weiterentwicklung der Epiphyse zu einem soliden, drüsenartigen Gebilde war an der epithalamischen Ventrikelwand ein anatomischer Umbau durch die weitere Ausbildung der Comm. habenul. und Comm. post. zu verzeichnen (vgl. J. Ariëns Kappers 1960). Der Verlauf des

SKO hatte sich der veränderten Konfiguration der epithalamischen Ventrikelwand angepaßt. Im Vergleich zu den Embryonen war das SKO der adulten

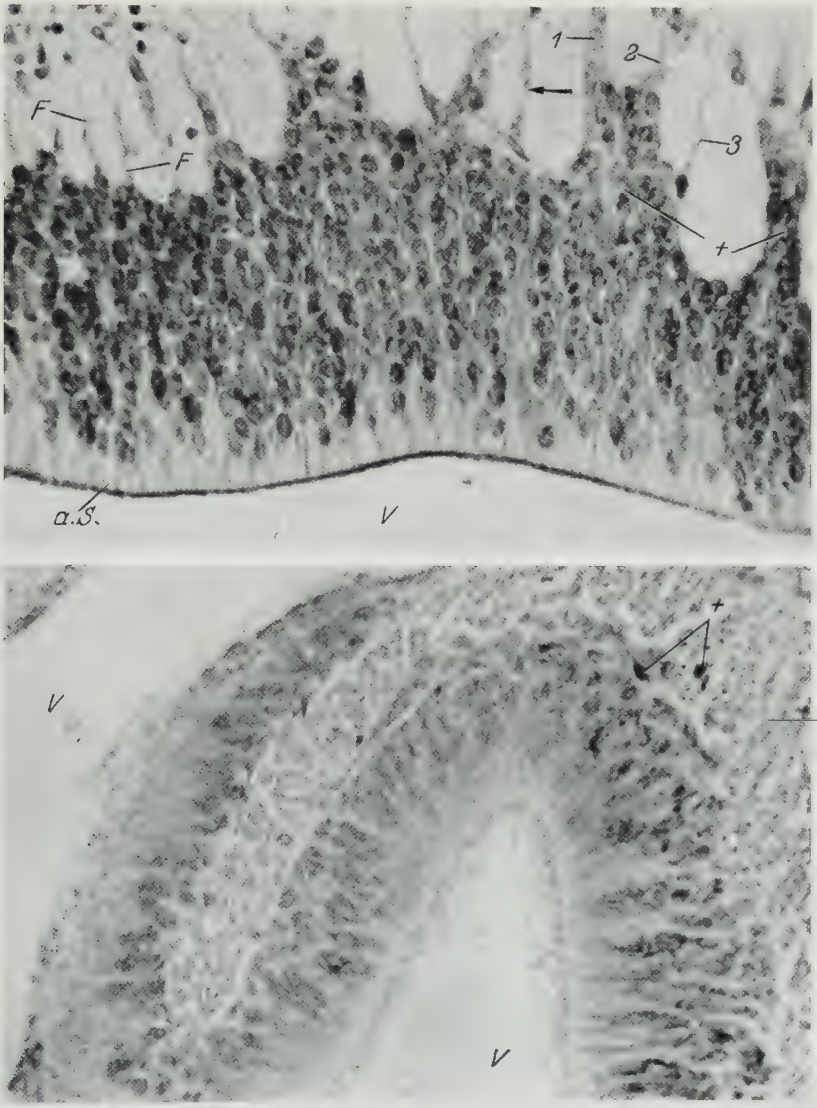


Abb. 20 a u. b. Subkommissuralorgan der weißen Maus. Sagittalschnitte. Bouin fix. Chromalaun-hämatoxylin-Phloxin. a Embryo, 12 mm Scheitel-Steiß-Länge. *V* Ventrikellichtung; *a.S.* apikaler Sekretsaum; *F* von der basalen Zellreihe abgehende Ependymfortsätze; + nach der äußeren Oberfläche gerichtete stammartige Zellverbände, die als Ursprung verschieden starker (*1, 2, 3*) peripherer Verbindungsstränge dienen; ↑ ein Strang aus bipolaren Zellen. Vergr. 350fach. b Adultes Tier. Niedriger, sekretarmer ependymaler Zellverband. *V* Ventrikellichtung; *C.p.* Comm. post. Hypendymale Zellverbände fehlen. + Vereinzelte hypendymale Zellen mit dunklem Sekret. Vergr. 350fach

Maus deutlich niedriger. Das SKO der geschlechtsreifen Maus ist sekretarm. Das Cytoplasma seiner Zellen wies zwar eine allgemeine blaßblaue Anfärbung auf, ließ aber nur gelegentlich am apikalen und basalen Pol des Zellkerns feine, staubförmige Granula erkennen. Ein apikaler Körnchensaum dagegen fehlte.

An Stelle der bei den Embryonen häufigen basalen Zellstränge und Ependymfortsätze konnten im adulten SKO nur noch vereinzelte Züge von Gliafasern beobachtet werden, die zum Teil von schwach angedeuteten basalen Zellkegeln ausgingen. Im Verband dieser Stränge wurden häufig Gefäße nachgewiesen. Die dünne, locker gebaute hypendymale Lage enthielt nur wenige Gliazellen, die in kaudaler Richtung an Zahl zunahmen. Nur in einigen wurden feine, elektiv gefärbte Granula dargestellt.

Beurteilung. Durch die Abnahme der Epithelhöhe, der Flächenausdehnung und der peripheren Verbindungen scheint es, daß das SKO der adulten weißen Maus dem Embryonalzustand gegenüber an Bedeutung verloren hat. Seine zur äußeren Grenzmembran und zu den Gefäßen ziehenden Zellstraßen haben sich zurückgebildet, ohne daß es zur Ausdifferenzierung einer nennenswerten hypendymalen Gliaformation kam. Der Sekretmangel in der basalen ependymalen Zellage und in der hypendymalen Glia des adulten Mäuse-SKO enthält offenbar den Hinweis, daß seine sekretorischen Produkte vorwiegend in den Liquor abgegeben werden. Da aber kein gut ausgebildeter Körnchensaum beobachtet wurde und der Reissnersche Faden sehr zart war, scheint auch diese Aktivität nicht sehr wesentlich zu sein. Vielleicht ist die Orientierung der Tätigkeit des Mäuse-SKO in Richtung auf den Ventrikel bereits im Embryonalzustand angedeutet, wo elektiv gefärbte Körnchen in der basalen Zellreihe und in den Zellsträngen nicht beobachtet wurden. Hier wird eine klare Antwort erst nach der Erforschung des ganzen Individualzyklus mit Hilfe der Paraldehydfuchsin-Methode möglich sein. Rein morphologisch ist aber nach den bereits vorliegenden Befunden die Entwicklung des Mäuse-SKO als regressiv zu beurteilen.

b) Cavia cobaya

Bei einem anderen Nager, dem Meerschweinchen, ist es möglich zu zeigen, daß trotz Rückbildung der zur äußeren Grenzmembran gerichteten Zellstraßen, das SKO sekretorisch aktiv bleibt, wenn gleichzeitig ein starker hypendymaler Gliaverband ausgebildet wird.

Das relativ hohe SKO des Meerschweinchens wurde mit der Chromalaunhämatoxylin-Methode bereits von Wislocki und Leduc (1952), Oksche (1956) und Bosque u. a. (1958) bearbeitet. Es weist einen deutlichen apikalen Sekretsaum auf und verfügt auch im Bereich der aus epithelähnlichen Zellen bestehenden hypendymalen Inseln, die sich ganz vom ependymalen Sekretverband gelöst haben, über erhebliche Sekretmengen.

Hier ist nur zu vermerken, daß im eigenen Material keine Brücken der hypendymalen Inseln zur äußeren Grenzmembran wie etwa bei Hund und Rind nachgewiesen werden konnten. Dafür waren aber die Inseln selbst so stark vaskularisiert wie bei keinem zweiten von mir untersuchten Wirbeltier.

5. Primates

Macaca

Das SKO der Neonaten von *Macaca mulatta* hat einen hohen ependymalen Verband, apikales und basales Sekret und von der basalen Reihe ausgehende Zellstränge, die die Comm. post. durchsetzen (Hofer 1958).

Das SKO adulter Rhesusaffen (Abb. 21a, b) zeigt nach eigenen Beobachtungen eine interessante Möglichkeit der peripheren sekretführenden Gefäß-

verbindungen, die sich von den Verhältnissen bei anderen Säugern unterscheidet. Zur Untersuchung gelangten sagittale Schnittserien eines adulten ♂ und ♀ Tieres,

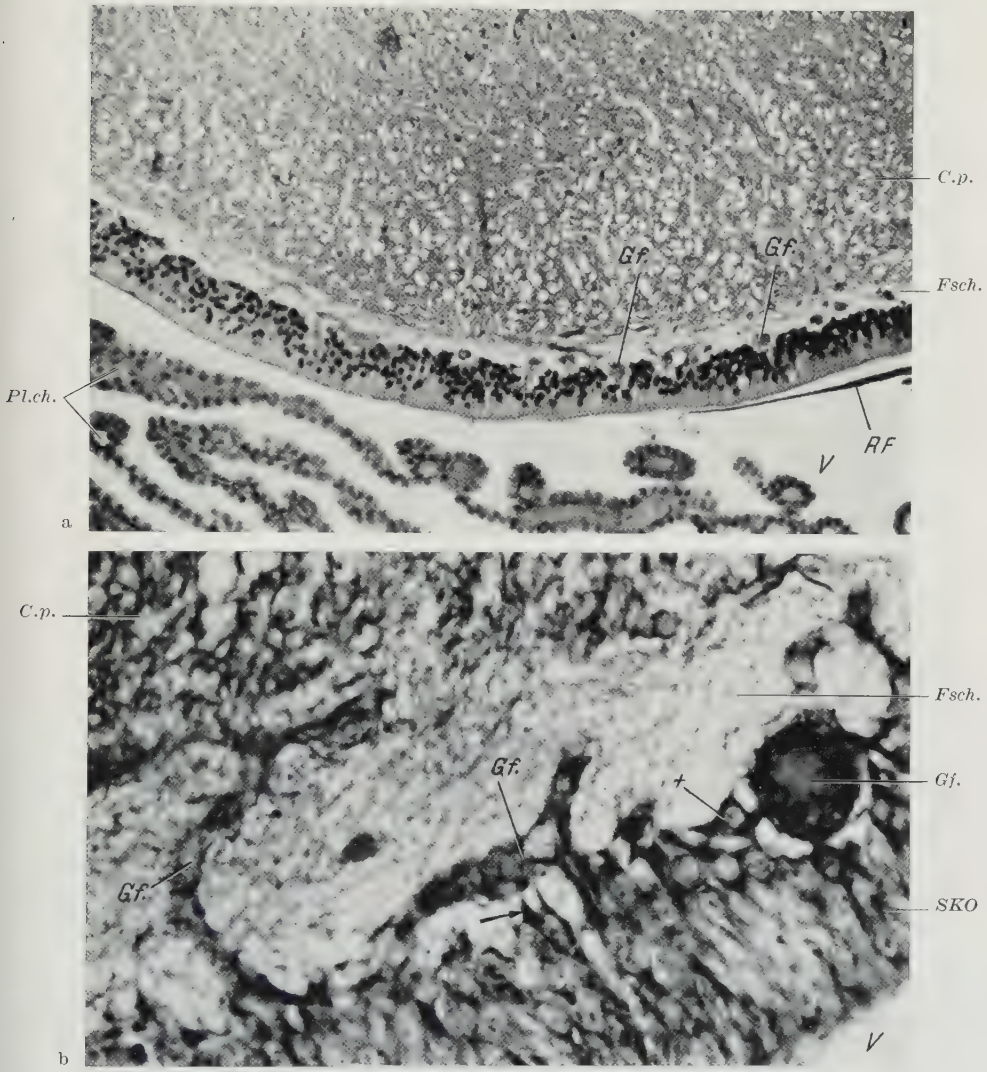


Abb. 21a u. b. Subkommissuralorgan des Rhesusaffen. Adultes ♂ Tier. a Übersicht. Sagittalschnitt. Bouin fix. Chromalaunhämatoxylin-Phloxin. Vergr. 140fach. *V* Ventrikellichtung; *Pl.ch.* Plexus chor. ventr. III; *RF* Reissnerscher Faden; *Gf.* Gefäße in muldenförmigen Einsenkungen an der Basis des ependymalen Zellverbandes; *C.p.* Comm. post.; *Fsch.* zellarme Faserschicht, die kein hypendymales Parenchym enthält. b Objekt wie in Abb. 21a. Sagittalschnitt. Paraldehydfuchsin-fast green-Orange G. Vergr. 560 fach. *V* Ventrikellichtung; *SKO* ependymaler Zellverband mit Sekretschollen (dunkel); *C.p.* Comm. post.; *Fsch.* zellarme Faserschicht mit Gefäßen (*Gf.*); ↑ kurze sekrethaltige Ausläufer der basalen Zellen mit Gefäßstempeln; + sternförmige Zelle mit Gefäßbeziehungen

deren parallele Schnitte mit Chromalaunhämatoxylin, Paraldehydfuchsin und Molybdänhämatoxylin gefärbt wurden.

Im Vergleich zu anderen Wirbeltieren fiel die regelmäßige, fast geradlinige basale Begrenzung des SKO auf, die nicht durch Zellhügel, -straßen oder -stränge

unterbrochen wurde. Die hypendymale Zone war sehr schmal, faserig, locker gebaut und zellarm. Durch die elektiven Sekretfärbungen wurden hier keine sekrethaltigen Gliazellen nachgewiesen. Mit Molybdänhämatoxylin gelang es im Hypendym Astrocyten darzustellen, die keine morphologischen Kennzeichen sekretorischer Hypendymzellen trugen und ihre Fortsätze in die kernlosen Gliafaserbündel entsandten, durch die eine Felderung der Fasermassen der Comm. post. zustande kommt. Im Sinne der bisherigen Ausführungen wäre bei einem Mangel an besonderen basalen Zellverbänden, die die Gefäßverbindungen auf größere Entfernung herstellen, mit einem verkümmerten SKO zu rechnen. Das SKO der beiden untersuchten Exemplare zeigte jedoch eine gute Differenzierung und aktive, in 5—6 Reihen angeordnete Zellen. Es war zwar bedeutend niedriger als bei Hund, Katze und Rind, aber keineswegs sekretarm. Das Sekret ließ sich erst durch das Paraldehydfuchsin richtig erfassen. An der freien Ventrikeloberfläche des SKO wurde ein sehr regelmäßiger, starker Reissnerscher Faden beobachtet, den feinste Fädchen mit dem apikalen Zellpol verbanden. Der gleichmäßige apikale Sekretsaum ließ sich nur mit der Paraldehydfuchsin-Methode darstellen. Die 2—3 basalen Zellreihen zeichneten sich durch Körnchenkappen aus, die dem ventrikelfernen Kernpol angelagert und nach der Peripherie gerichtet waren. Molybdänhämatoxylin-Präparate zeigten sehr deutlich, daß an der Basis des SKO große Gefäße innerhalb von muldenförmigen Eindellungen des Parenchyms an die sekrethaltigen Zellen herantreten. Diese Gefäße waren in sagittalen Schnittserien meist im Querschnitt zu sehen. Sie wurden entweder von allen Seiten oder nur im Halbkreis von kurzen, spießartigen Ausläufern der eng benachbarten Zellen des SKO umgeben (Abb. 21b). Diese Fortsätze ließen sich mit Paraldehydfuchsin elektiv färben, einschließlich ihrer zarten stempelartigen Differenzierung, die direkt der Gefäßwandung anliegt. Der Ausfall der histochemischen Reaktionen (Perjodsäure-Schiff, Astrablau) sprach dafür, daß der Stoff, der den Zellfortsatz füllt, mit dem im Perikaryon nachweisbaren identisch ist. Damit waren zahlreiche sekrethaltige Gefäßverbindungen des SKO gesichert.

Beurteilung. Das SKO adulter Rhesusaffen bildet einen starken Reissnerschen Faden, enthält aber noch mehr Sekret in seinen basalen Zellreihen, wobei die äußerste spießartige, mit Sekret gefüllte Fortsätze zu den Gefäßen entsendet. Diese Gefäßverbindungen erfüllen offenbar funktionell die Rolle der hypendymalen Gliazellen, deren Ausbildung hier unterbleibt.

Bei einem 17jährigen *Schimpansen* (Hofer und Oksche, unveröffentlichte Befunde) fand sich ein zurückgebildetes Subkommissuralorgan. Höhere, noch sekrethaltige Ependymbezirke gingen stellenweise in niedrige sekretfreie Epithelstrecken über, so daß der Eindruck inselartiger Parenchymformationen entstand. Über das Verhalten der Gliafasern in der Nachbarschaft dieses SKO s. S. 607. Über das SKO anderer Affen (unter anderem *Cebus*) vgl. Hofer (1958). Das SKO der Affen (vgl. auch S. 601) interessiert besonders in Hinblick auf die eigenartige Rückbildung des SKO beim Menschen (vgl. Oksche 1960). Systematische Untersuchungen bei Affen könnten wesentlich zur Klärung der physiologischen Bedeutung des menschlichen SKO beitragen.

6. Homo

Nach den älteren Untersuchungen von Bauer-Jokl (1919), Puusepp und Voss (1924), Krabbe (1925), Opalski (1934) und Pesonen (1940a, b), Pesonen und Setälä (1941), die noch vor der Einführung der elektiven Sekretfärbungen durchgeführt wurden, ist das SKO des embryonalen menschlichen Gehirns gut ausgebildet (vgl. Hochstetter 1921, 1929 und Turkewitsch 1933). Trotzdem wurde kein Reissnerscher Faden nachgewiesen. Die

Rückbildung des menschlichen SKO beginnt gegen das 4. Lebensjahr. Nach dem 30. oder 40. Lebensjahr wurden nur noch inselartige Überreste des SKO gefunden. Nach den Erfolgen, die seit 1952 mit der Chromalaunhämatoxylin-Methode am SKO verschiedener Wirbeltiere erzielt wurden, erschien auch eine Neubearbeitung des menschlichen SKO angezeigt. Oksche (1956) wies mit der Chromalaunhämatoxylin-Methode im SKO eines 72 mm langen (Scheitel-Steiß) Embryos einen elektiv gefärbten Saum an der freien Ventrikeloberfläche nach, der stellenweise Körnchen erkennen ließ. Dem histologischen Bild dieses voll ausgebildeten SKO wurde ein inselartiger Überrest aus dem Gehirn eines Erwachsenen gegenübergestellt, der keine elektiv färbbare Substanz enthielt (vgl. Oksche 1956, S. 410). 1958 wurde von Wislocki und Roth ein ähnlicher Befund am SKO eines 70 mm langen Embryos veröffentlicht, den die Verfasser in Unkenntnis meiner Mitteilung für die erste Sekretdarstellung im menschlichen SKO hielten. Wislocki und Roth erzielten eine Sekretfärbung auch mit Paraldehydfuchsin und mit der PAS-Reaktion von McManus. Außer dem intensiver gefärbten Material an der freien Ventrikeloberfläche lag auch noch eine blasse Tingierung des apikalen Cytoplasmas vor, das in einigen Zellen staubartige, winzige Körnchen erkennen ließ. Ein Reissnerscher Faden wurde nicht beobachtet. Die Zellen des von Wislocki und Roth untersuchten Objektes enthielten im Perikaryon auch noch diffus verteilte Glykogenkörnchen. Auf die Morphologie der peripheren Verbindungen des embryonalen menschlichen SKO gingen Wislocki und Roth nicht ein.

Inzwischen konnte ich vier weitere operativ entfernte (Uterusexstirpation, Ausräumung) menschliche Embryonen in der Länge von 75—135 mm untersuchen, die noch lebenswarm konserviert wurden. 1. 75 mm (Kaformacet fix.), 2. 90 mm (Lison fix.), 3. 130 mm (Kaformacet fix.), 4. 135 mm (Bouin fix.).

Die Struktur des SKO war besonders gut in Eisenhämatoxylin- (Heidenhain) und Molybdänhämatoxylin-(Held) Präparaten zu sehen. Da bei allen vier Embryonen eine weitgehende Übereinstimmung des Bauprinzips festgestellt wurde, kann die Beschreibung gemeinsam erfolgen.

Die Lage und die Gestalt des auf die noch hohle Epiphyse folgenden sehr hohen SKO lassen sich am besten aus der Abb. 22a ersehen. Es reicht weit nach kaudal, noch in den Recessus mesocoelicus hinein. Die ventrikelnahen Zellreihen wiesen besonders schmale, hohe Zellen mit scharf gezeichneten Zellgrenzen auf (Abb. 24a). In der innersten Zellreihe fielen insbesondere die zahlreichen Mitosen auf. An der Basis des SKO ging die streng geordnete Palisadenstruktur des ependymalen Parenchyms allmählich in einen lockerer gefügten Bereich über, der zahlreiche Gefäße enthielt (Abb. 24a, b). Dieser Abschnitt war, besonders weiter kaudal (Abb. 23a), an manchen Stellen hügelartig nach dorsal ausgebuchtet und entsandte zahlreiche Ependymfortsätze zur äußeren Grenzmembran und zu den in die Tiefe dringenden Gefäßen. Die Endfüße dieser Fortsätze erschienen besonders groß und scharf gezeichnet. Stets handelte es sich dabei um cytoplasmatische Ausläufer einzelner Zellen und nicht um Zellketten. Die Fortsätze konnten aber bündelweise zusammengefaßt sein. Abgesehen vom Fehlen der aus bipolaren Elementen bestehenden Zellketten, erinnerte die Organisation des embryonalen menschlichen SKO am ehesten an das SKO neugeborener Katzen. In Analogie zu den übrigen Wirbeltieren kann man die locker gefügte basale Zellformation als einen Vorläufer der hypendymalen inselartigen Gliaverbände ansehen. Dem frühen Entwicklungsstadium entsprechend, lagen hier noch keine höher differenzierten Gliazellen vor. Die zahlreichen zu den Membranae limitantes aufsteigenden, sehr kräftigen Ependymfortsätze boten ein eindrucksvolles und nur für das SKO charakteristisches Bild, da die benachbarten Abschnitte der Ventrikelwand noch eine nicht differenzierte ependymale Matrix aufwiesen (Abb. 22a, 23a).

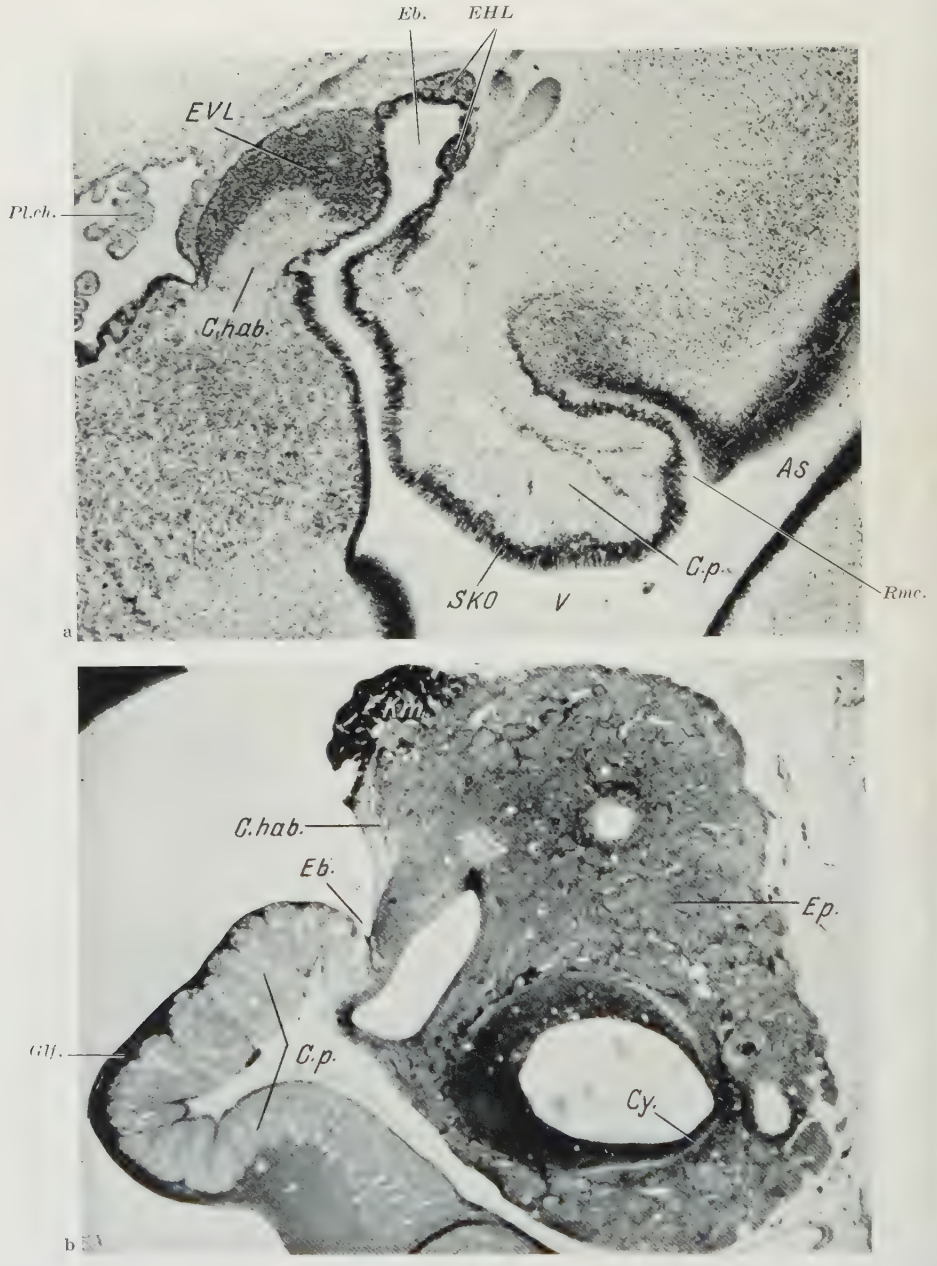
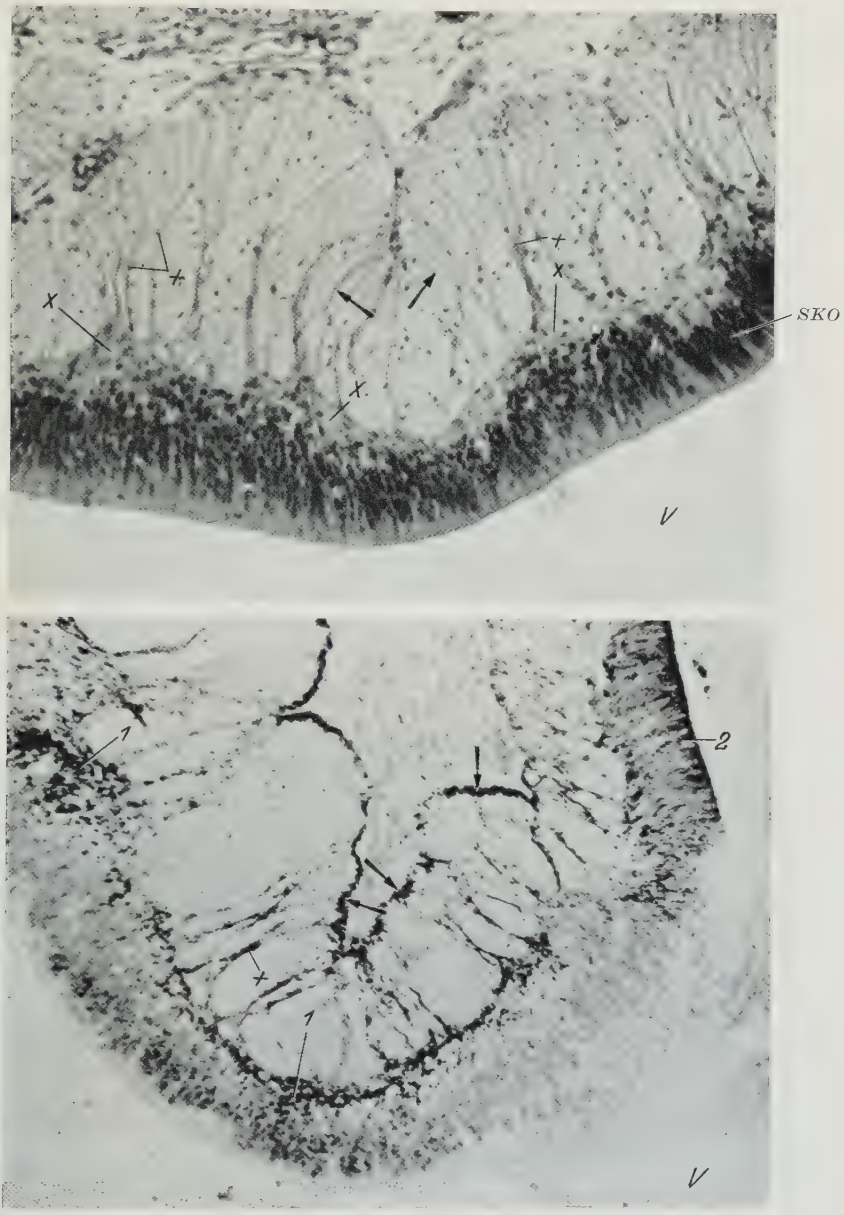


Abb. 22 a u. b. a Epiphyse und Subkommissuralorgan (SKO) eines menschlichen Embryos von 135 mm Länge. Sagittalschnitt. Bouin fix. Chromalaunhämatoxylin. Vergr. 56fach. *V* Ventrikellichtung; *Pl.ch.* Plexus chor. ventr. III; *Eb.* Epiphysenbucht des 3. Ventrikels; *C. hab.* Comm. habenularum; *EVL* Anlage des Epiphysenvorderlappens; *EHL* Anlage des Epiphysenhinterlappens; *C.p.* Comm. post.; *Rmc.* Recessus mesocoelicus; *AS* Aquaeductus Sylvii. b Epiphyse und Comm. post. (*C.p.*) eines etwa 30jährigen Mannes. Sagittalschnitt. Formol-Bouin fix., Molybdänhämatoxylin (Held). Vergr. 10fach. *C. hab.* Comm. habenularum; *Ep.* Epiphyse mit Cysten (*Cy.*) und Konkrementen (*Km.*); *Eb.* Epiphysenbucht; *Glf.* Gliafaserschicht. SKO zurückgebildet (s. Abb. 25b)

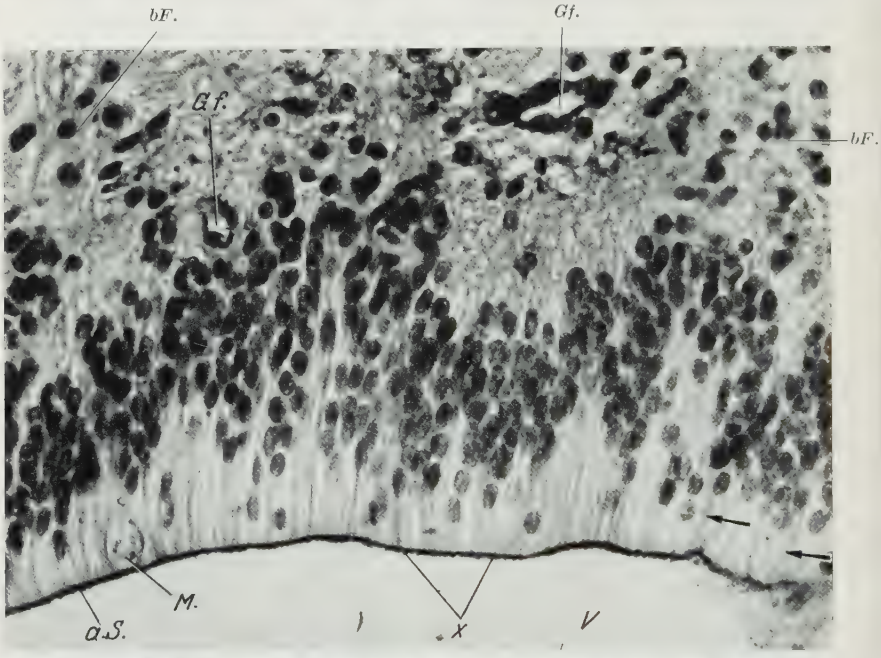


a

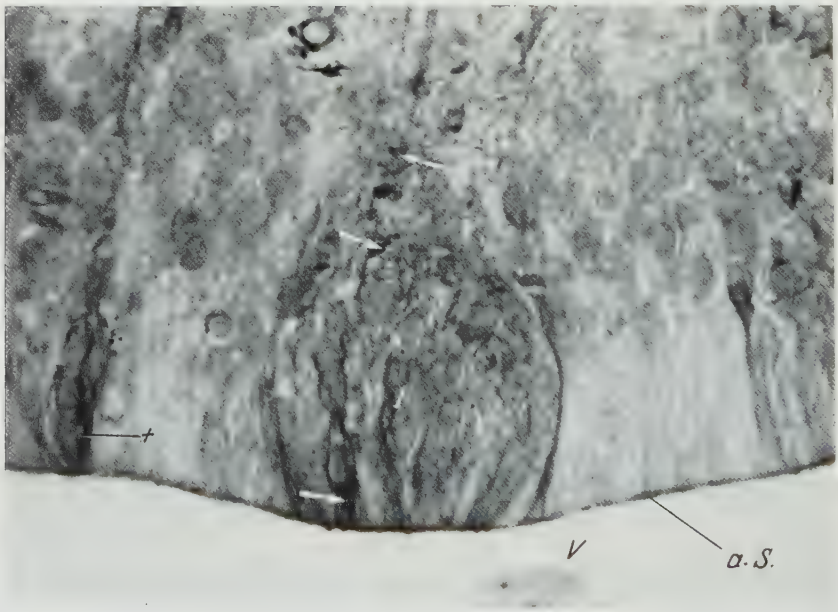
b

Abb. 23 a u. b. a Subkommissuralorgan eines menschlichen Embryos von 135 mm Länge. (Objekt wie in Abb. 22 a.) Eisenhämatoxylin-Phloxin. Vergr. 140fach. *V* Ventrikellichtung; *SKO* ependymaler Verband des Subkommissuralorgans; *x* locker gefügte basale Zellformationen mit Ependymfortsätzen, die baumartig verzweigt (+) zur äußeren Grenzmembran und arkadenförmig (↑) zu Gefäßtrichtern aufsteigen. b Glykogennachweis im Subkommissuralorgan eines menschlichen Embryos von 90 mm Länge. Sagittalschnitt. Lison fix (0° C), Bleitetraacetat-Schiff-Reaktion (Diastasekontrolle durchgeführt). Vergr. 116fach. Glykogen dunkel. *1* Starke Glykogenanhäufung an der Basis des SKO; + durch Glykogenkörnchen markierte Zellfortsätze; ↑ glykogenreiche Endfüße (dunkel). An der freien Ventrikeloberfläche (*V* Ventrikellichtung) Glykogen nur im Recessus mesocoelicus (*2*)

Die Paraldehydfuchsin-Methode gab einen kontrastreicheren und präziseren Sekretnachweis als das Chromalaunhämatoxylin-Verfahren. Der apikale Saum



a



b

Abb. 24 a u. b. a Subkommissuralorgan eines menschlichen Embryos von 130 mm Länge. Sagittalschnitt. Kaformacet fix., Chromalaunhämatoxylin-Phloxin. Vergr. 400fach. *V* Ventrikellichtung; *a.S.* apikaler elektiv gefärbter Saum (bei × Körnchenzeichnung); ↑ mit Chromalaunhämatoxylin elektiv gefärbtes Cytoplasma; *M* Mitose; *bF.* basale Zellformation; *Gf.* Gefäße. b Objekt wie in Abb. 24a. Perjodsäure-Leukofuchsin-Reaktion, saures Hämalaun. Vergr. 560fach. Dunkle Stellen = positiver Reaktionsausfall; *a.S.* elektiv gefärbter apikaler Saum; *I* zwiebelförmiger Zellverband mit positiver Reaktion des Cytoplasmas; ↑ stark positive Granulierung; + elektiv dargestellte Substanz

war sehr deutlich (Abb. 24a, b), meistens fast homogen, stellenweise aber auch granulär. An einigen, vom Ventrikellumen her etwas eingebuchteten Stellen wurden sekrethaltige apikale Zellkuppen beobachtet, die in die Lichtung vorragten. Ein Reissnerscher Faden ließ sich in keinem Fall feststellen. Die elektive Färbbarkeit des Cytoplasmas nahm von apikal nach basal allmählich ab. Nur in den innersten Zellagen konnten bei der stärksten Vergrößerung kleine Körnchen erkannt werden. Eine sehr gute Darstellung des Sekretes ergab sich bei dem 75 mm langen Embryo durch die Anwendung der PAS-Methode von Hotchkiss in Verbindung mit dem Leukofuchsinreagens von Graumann. Mit diesem Verfahren ließen sich scharf begrenzte, sekretreiche Zellkomplexe von knospiger Gestalt darstellen, die bis in die lockere basale Zone verfolgt werden konnten (Abb. 24b). Auch in der letzteren lag elektiv gefärbtes Material vor. Verschiedentlich waren sowohl die ependymalen Zellausläufer als auch der Endfuß mit Paraldehydfuchsin und dem Leukofuchsinreagens leuchtend rotviolett gefärbt. Hier sind aber noch weitere Beweise zu erbringen. Die Ependymfortsätze und ihre Endfüße enthielten reichlich Glykogen. Auf diese Lokalisation des Glykogens (Abb. 23b) fand sich bei Wislocki und Roth (1958) kein Hinweis. Am eigenen Material konnte deutlich beobachtet werden, daß der histochemische Glykogennachweis in dem mit gekühlter Lisonscher Lösung (0° C) konservierten SKO sowohl quantitativ als auch topisch wesentlich präziser ausfiel als am Bouin-Material, das von Wislocki und Roth verarbeitet wurde. An den in Trichtern eindringenden Gefäßen waren die Endfüße mit Glykogen überladen. Eine starke Glykogenablagerung am apikalen Pol des SKO fiel regelmäßig nur im Recessus mesocoelicus auf (Abb. 23b).

Es ist möglich, daß die Glykogenmenge eine Beziehung zur Aktivität und Sekretbildung im SKO hat (vgl. Oksche 1958). Im Anuren-SKO ist das Glykogen erheblichen funktionellen Schwankungen unterworfen.

Das SKO eines 350 mm langen (Scheitel-Steiß) Embryos (9. Monat) war nicht so günstig konserviert und daher für cytologische und cytochemische Untersuchungen ungeeignet. Es hatte aber im Vergleich zu den 70—135 mm langen Embryonen deutlich an Höhe eingebüßt.

Als Beispiel für die Verhältnisse beim erwachsenen Menschen kann das SKO eines plötzlich verstorbenen, etwa 30jährigen Mannes dienen, dessen Gehirn gleich nach dem Tode durch intraarterielle Perfusion des Fixierungsmittels (Formol, mit Bouin nachfixiert) konserviert wurde. An Stelle eines zusammenhängenden ependymalen Verbandes wurden nur noch ganz vereinzelte Inseln mit nur gelegentlich zwei- bis dreireihigem Epithel angetroffen (Abb. 25b). Oft lag hier eine leichte Einbuchtung vom Ventrikel her vor. Die kleinen Zellkerne wiesen auf die Inaktivität dieser Inseln hin, die, wenn überhaupt, nur noch ganz geringe Mengen des elektiv färbbaren Sekretstoffes enthielten. Im übrigen war der mächtige Wulst der Comm. post. nur von kubischen bis platten, einschichtigen Epithelzellen überzogen. Zwischen dieser Epithellage und den Bündeln der Comm. post. lag eine relativ breite, hauptsächlich aus Gliafasern bestehende Zone, in der zahlreiche kleinkernige Zellen zu erkennen waren. Diese verhielten sich im Chromalaunhämatoxylin-Präparat wie gewöhnliche Astrocyten und Oligodendrocyten. Sekrethaltige Hypendymzellen oder deren Verbände fehlten vollkommen. Mit Molybdänhämatoxylin waren aber deutlich Astrocyten zu

erkennen, deren Fortsätze in die Gliafaserbündel strebten, die septenartig die Comm. post. in eine Reihe von Feldern unterteilen. Diese Faserzüge entsprechen

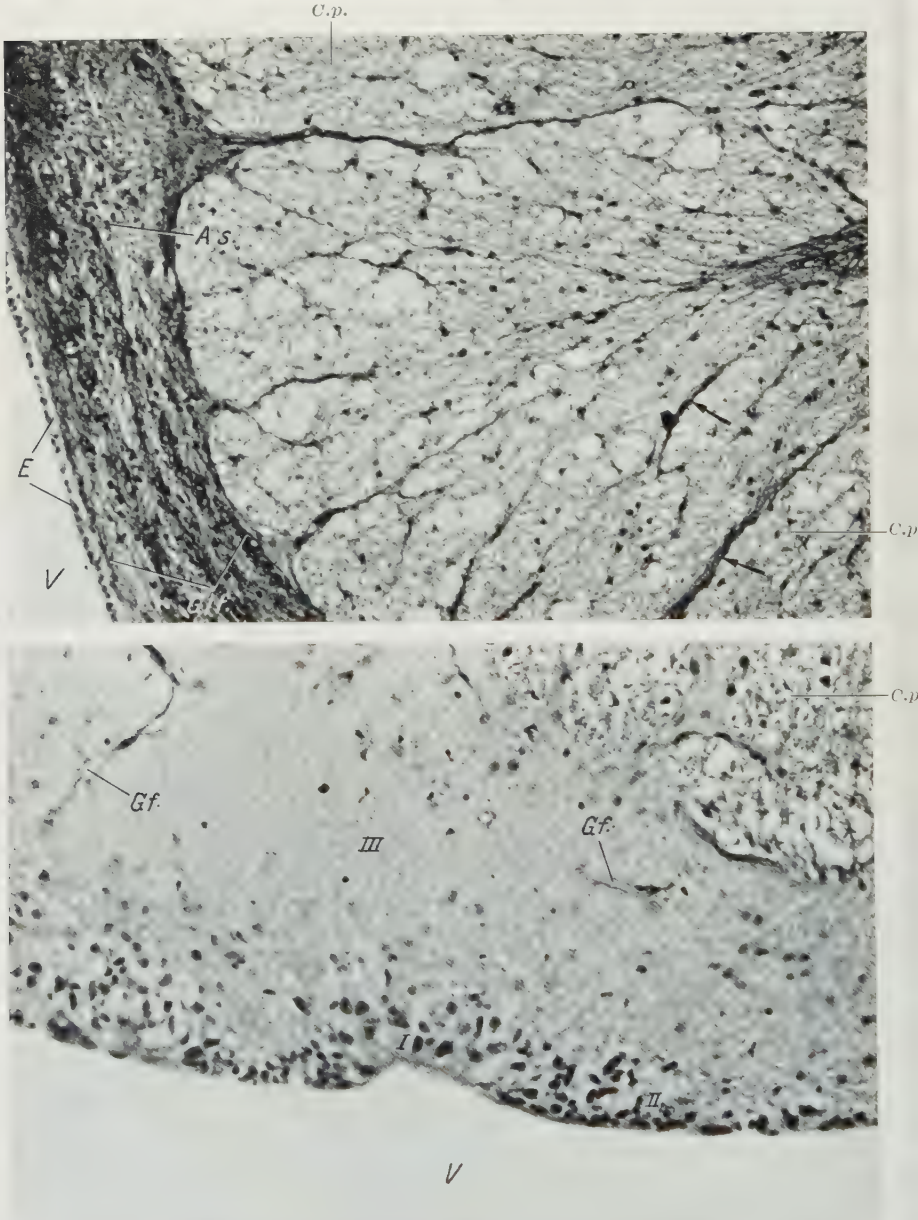


Abb. 25 a u. b. a Rückgebildetes Subkommissuralorgan eines erwachsenen Menschen (vgl. Abb. 22b). Sagittalschnitt. Formol-Bouin fix., Molybdänhämatoxylin (Held). Vergr. 140fach. *V* Ventrikellichtung; *E* einschichtiges kubisches ependymales Epithel; *Glf.* Gliafaserschicht mit dunklen Astrocytenkernen (*As.*); *C.p.* Faserbündel der Comm. post.; ↑ Gliafaserbündel, die zu einem Gefäßtrichter streben. b Objekt wie in Abb. 25a. Perjodsäure-Leukofuchsin-Reaktion. Vergr. 224fach. *I* Inselartiger Überrest des SKO an einer leicht eingebuchteten Stelle der Ventrikeloberfläche (*V* Ventrikellichtung); *II* einschichtiges kubisches bis plattenförmiges ependymales Epithel; *C.p.* Faserbündel der Comm. post.; *III* subependymale Faserschicht ohne spezifische Faserdarstellung; *Gf.* Gefäße (im Vergleich zum Embryonalzustand gefäßarm)

räumlich dem Verlauf der gebündelten Ependymfortsätze, wie sie während des Embryonallebens anzutreffen sind (Abb. 25a).

Beurteilung. Das SKO des Menschen ist im 3.—5. Embryonalmonat sehr gut differenziert und enthält Sekret, vorwiegend an der freien Ventrikeloberfläche. Ein Reissnerscher Faden wird aber nicht gebildet. Elektiv gefärbte Strukturen wurden auch an der Basis des SKO beobachtet. Im 9. Embryonalmonat entsprach die Höhe des SKO etwa den bei adulten Rhesusaffen vorgefundenen Verhältnissen. Weitere Untersuchungen am Sektionsmaterial von älteren Embryonen, Neugeborenen und Kindern sind erforderlich (vgl. Oksche 1960). Das SKO erwachsener Menschen ist aber ohne Zweifel zurückgebildet, seine Reste erscheinen funktionsuntüchtig.

VII. Vergleichend anatomische Analyse und Deutung der Strukturen des Wirbeltier-Subkommissuralorgans

a) Das Subkommissuralorgan als polar differenziertes sekretorisches Organ

Unter den Ergebnissen, die in eigenen vergleichend anatomischen Studien am SKO gewonnen wurden, erscheint der Nachweis eines *Bauprinzips* besonders bemerkenswert: das SKO ist durch zwei in entgegengesetzte Richtungen polar differenzierte Zellreihen gekennzeichnet (Abb. 26). Die Zellen des SKO unterscheiden sich von anderen Ependymzellen dadurch, daß sie ein granuläres Sekret von bestimmten färberischen Eigenschaften bilden, wobei ein *Sekretionszyklus* zu erkennen ist. Die Tatsache, daß ein räumlich begrenzter Ependymabschnitt so stark sezerniert, ist ungewöhnlich.

Bei allen Wirbeltieren, die einen mehrreihigen ependymalen Zellverband des SKO aufweisen (Abb. 26), ist die innere Zellreihe nach dem Ventrikel, die äußere, basale dagegen nach den gliösen Grenzmembranen (Membr. limit. superficialis und perivascularis) orientiert. Diese Verhältnisse können besonders deutlich am Beispiel des Grasfrosch-SKO gezeigt werden. Die innere Zellreihe besteht hier aus hohen zylindrischen, sezernierenden Epithelzellen, mit einer Sekretanhäufung am apikalen Zellpol (an der freien Ventrikeloberfläche), die basale dagegen aus Zellen, die mit langen Zellfortsätzen ausgestattet sind (Abb. 261a—d) und das Aussehen primitiver Ependym- und Gliazellen haben. Diese basale Zellreihe zeigt ein Sekretgefälle vom Perikaryon zur Fortsatzperipherie. Die Endfüße der basalen Ependymfortsätze, die nicht selten Sekret enthalten, finden sich am Ufer venöser meningealer Gefäße, die zum Teil sinusartig erweitert sind. Die Kapillaren beobachtet man dagegen in der Nähe der Perikaryen der basalen Ependymzellen (vgl. Abb. 5). Die morphologischen Verhältnisse, die am SKO vorliegen, sind komplizierter als in einem epithelialen Verband polar differenzierter Drüsenzellen, wo die basalen, dem Blutstrom benachbarten Abschnitte das für die Sekretbildung erforderliche Rohmaterial sammeln und das reife Sekret durch den apikalen Zellabschnitt zur Oberfläche tritt (Bargmann 1959). Dieses Drüsenschema hat nur für die ventrikelnahe Zellreihe des SKO Gültigkeit, nicht aber für die basale, aus Tanycyten bestehende. Läßt man die Anschauung Olssons (1958) über die Sekretbildung und -abgabe im SKO gelten, die das Ziel der Sekretabgabe hauptsächlich in der Bildung des Reissnerschen Fadens sieht, so müßte man annehmen, daß die basalen Tanycyten nur das für die Sekretbildung erforderliche Rohmaterial an die ventrikelnahen Zellen heranbringen.

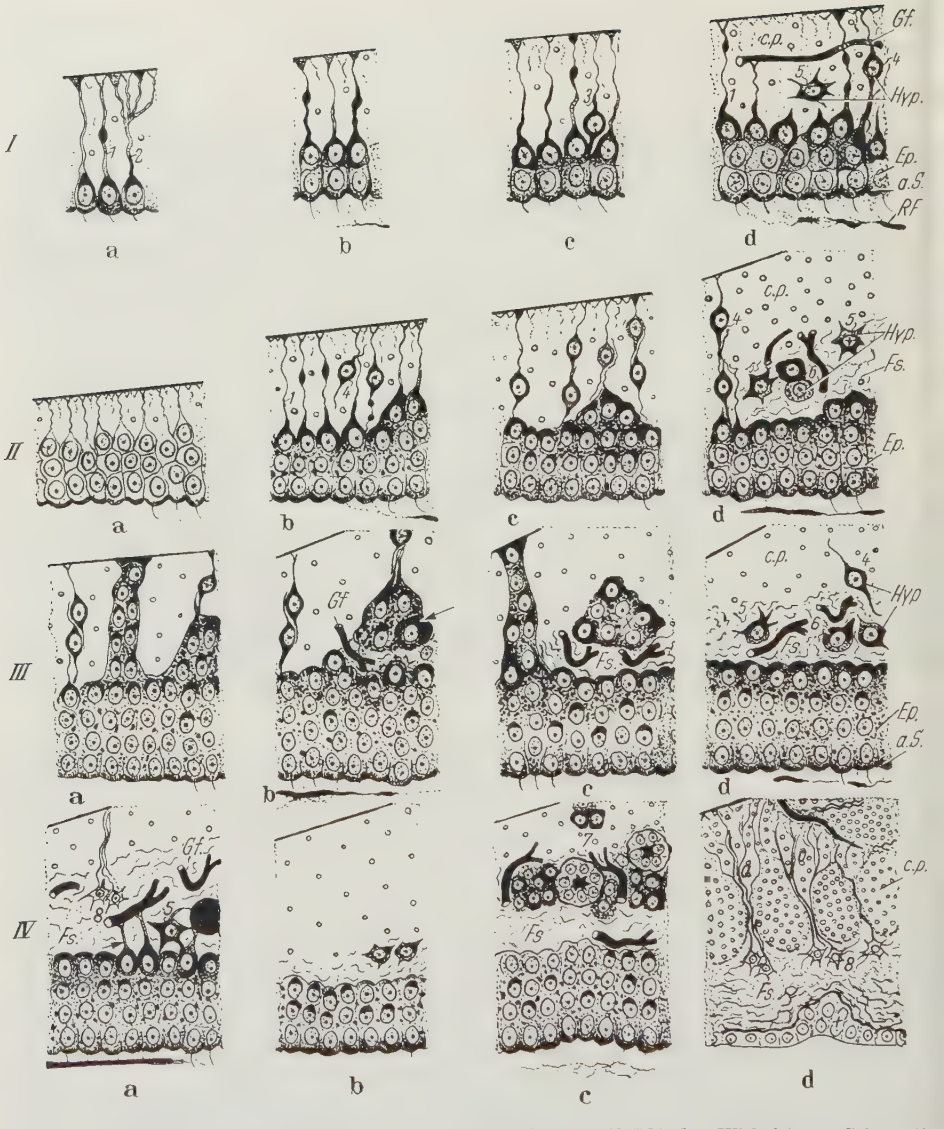


Abb. 26. Differenzierung und Bau des Subkommissuralorgans (SKO) der Wirbeltiere. Schematisierte Darstellung. Sekret = schwarze Körnchen; *Gf.* Blutgefäße; *c.p.* Comm. post.; *Ep.* ependymaler Zellverband des SKO; *a.S.* apikaler Sekretsaum; *RF* Reissnerscher Faden; *Hyp.* hypendymale Zellformationen des SKO; *Fs.* lockere Faserschicht; *1* ependymale Tanycyten; *2* stark verzweigte ependymale Tanycyten; *3* extraependymaler Tanycyt; *4* bipolare; *5* sternförmige; *6* abgerundete, blasige hypendymale Gliazellen; *7* rosetten- und schlauchförmige hypendymale Formationen; *8* gewöhnlicher Faserastrocyt; *o* Gliafaserbündel. *I* Primitive Organisationsstufe des SKO der Anuren. Von a—d allmähliche Dickenzunahme der Ventrikelwand. *II* Bildung der hypendymalen Zellformation im SKO der Katze. Umwandlung ausgewanderter bipolarer Zellen in sternförmige und abgerundete Elemente. Von a—d allmähliche Dickenzunahme der Ventrikelwand. a Junger Katzenembryo. b Neugeborene Katze, dünnwandiger rostraler Wandabschnitt. c Neugeborene Katze, verdickter kaudaler Wandabschnitt. d Erwachsene Katze. Vom ependymalen Zellverband vollständig losgelöste hypendymale Formation. *III* Bildung der hypendymalen Zellformation im SKO des Hundes. Hypendymale Zellformationen leiten sich sowohl von einzelnen ausgewanderten Zellen, als auch von ganzen abgesprengten Zellverbänden ab. Von a—d allmähliche Dickenzunahme der Ventrikelwand. a Ketten bipolarer hypendymaler Gliazellen und breite epitheliale Straßen zur äußeren Grenzmembran. b Basaler Zellkegel (↑) des ependymalen Zellverbandes. c Verselbständigung eines inselartigen hypendymalen Zellverbandes (×). d Lockere Anordnung sekrethaltiger hypendymaler Gliazellen.

Dagegen spricht die Beobachtung, daß in den Ventrikel injizierte Farbstoffe innerhalb von Tanycytenfortsätzen in peripherer Richtung transportiert werden (Horstmann 1954, J. Ariëns Kappers 1956), sowie auch das Verhalten der neurosekretorischen Ganglienzellen, die sehr wahrscheinlich über einen durch Cytoplasmapulsationen aufrechterhaltenen Sekretstrom im Axon verfügen (Hild 1954, E. und B. Scharrer 1954, Bargmann 1954, Carlisle 1958; vgl. dazu Spatz 1958, Christ u. a. 1958).

Wenn auch ein direkter Vergleich eines subkommissuralen sekretorischen Tanycyten mit einer neurosekretorischen Ganglienzelle nicht möglich ist, zeigen beide Zelltypen in Hinsicht auf den Sekretionsablauf und auf die Ausrichtung ihres langen sekrethaltigen Zellfortsatzes auf die Blutgefäße eine Reihe gemeinsamer morphologischer Merkmale.

Durch die entgegengesetzte polare Differenzierung der Zellen, die die innere und äußere Begrenzung des SKO bilden (Abb. 26Ia—d), ist die sekretorische Aktivität des SKO in 2 Richtungen gelenkt:

1. auf die freie Ventrikeloberfläche, die vom Liquor umspült wird,
2. auf den venösen Schenkel des zugeordneten Gefäßapparats.

Olsson (1958a, b) sieht die wesentliche Aufgabe des SKO in der Sekretabsonderung in den Ventrikel, durch die der Reissnersche Faden gebildet wird. Da im Material Olssons die Gliaendfüße des SKO kein Sekret enthielten, war es ihm möglich, die funktionellen Betrachtungen über die Aktivität des SKO auf die Vorgänge an der freien Ventrikeloberfläche zu beschränken. Nachdem in dieser Studie bei verschiedenen Wirbeltieren sekrethaltige Endfüße subkommissuraler Ependym- und Gliazellen nachgewiesen wurden, liegt eine andere Diskussionsgrundlage vor, die bei der Planung neuer Versuche berücksichtigt werden muß. Wenn wir auch im SKO der Sekretakkumulation am Gefäßufer eine besondere Beachtung schenken, wird an der Bedeutung der ventrikulären Sekretabgabe (Olsson) grundsätzlich nicht gezweifelt.

Der Reissnersche Faden (s. Abb. 4, 5, 8b, 9, 13d, 17b, 21a) ist meines Erachtens ein durch Fixierung geronnener, erstarrter Sekretfluß. Daß der Reissnersche Faden keinen zellulären Apparat darstellt, geht schon aus den elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Afzelius und Olsson (1957) hervor, die durch eigene Befunde bei *Rana temporaria* ergänzt wurden (Oksche und Vogell, unveröffentlicht).

Die von Olsson (1957) beschriebene Sekretakkumulation im Reissnerschen Faden, die bei *Esox lucius* nach Durchtrennung des Rückenmarks proximal von der Schnittstelle auftrat, konnte von Sano und Hartmann (1959) bei *Tinca vulgaris* nicht beobachtet werden.

Eine elektiv färbbare Fadenstruktur wie der Reissnersche Faden ist keine Bildung, die nur für das SKO charakteristisch ist. Auch an der Oberfläche des mehrreihigen, flimmernden Rachendachepithels kann das mit Paraldehydfuchsin färbbare Sekret (Schleim) zu Fäden gerinnen, die weitgehend an den Reissnerschen Faden erinnern (s. Abb. 10a, b). Ähnliche geronnene Sekretfäden konnte ich auch in der Lichtung der alveolären Schleimdrüsen der Froschhaut

IV Verschiedenartige Differenzierung der basalen Zellreihe des SKO und der hypendymalen Zellverbände. a Adulter Rhesusaffe. Kurze sekrethaltige basale Zellfortsätze (↑) des Ependyms. b Adulte Maus. Niedriger ependymaler Verband mit ganz vereinzelten Hypendymzellen. c Adultes Rind. Insel-, schlauch- und rosettenförmige hypendymale Zellverbände. d Erwachsener Mensch. Inselartiger Überrest des SKO (+)

und in den Ausführungsgängen muköser und gemischter Speicheldrüsen (Material Schmidt, 1959) beobachten.

Die Form des geronnenen Sekretfadens ist meines Erachtens sowohl von der Viskosität des Sekretes, als auch von den Strömungsverhältnissen in dem sekretgefüllten Binnenraum bzw. Rohrsystem abhängig. Im ZNS der Anuren befindet sich der Liquor in lebhafter Strömung (Vonwiller und Wigodskaja 1934, Adam 1953). Dabei spielt der Flimmerschlag der Ependymzellen eine wesentliche Rolle. Örtlich kann es zur Wirbelbildung kommen (Adam). Den lebhaften Flimmerschlag des Temporarien-SKO konnte ich im Phasenkontrastmikroskop beobachten. Das Vorkommen echter Cilien wurde in eigenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen gesichert. Es ist denkbar, daß in dem engen rinnenförmigen epithalamischen Abschnitt des 3. Ventrikels das Sekret durch den lebhaften Flimmerschlag der apikalen Zellreihe und die Liquorströmung zu einem fadenförmigen Gebilde zusammengetrieben wird (s. Abb. 13d). Dagegen gerinnt das Sekret an der Oberfläche des breitflächigen Rachendachepithels. zu einer plattenartigen Struktur. Plattenartig geronnenes, mit Chromalaunhämatoxylin und Paraldehydfuchsin färbbares Sekret finden wir auch im Epiphysenschlauch des Frosches, der zwar eng und röhrenförmig ist, aber keine cilientragenden Zellen enthält (vgl. Oksche 1959/60).

Zur Frage der elektiv färbbaren Substanz in der Anurenepiphyse s. Oksche (1959/60) sowie Kelly und van de Kamer (1960).

Die Struktur des Reissnerschen Fadens zeigt von Art zu Art erhebliche Unterschiede (vgl. Abb. 8b, 9, 13d, 17b, 21a). Die Weite des epithalamischen Ventrikelabschnittes und des Aquaeductus Sylvii spielt dabei sicherlich eine wesentliche Rolle.

b) Ependymaler und hypendymaler Zellverband des Subkommissuralorgans

Von dem einfachen Bau des Anuren-SKO finden sich die verschiedensten Übergangsformen zu den für Säuger charakteristischen komplizierten Strukturverhältnissen (s. Abb. 26I—IV).

Das SKO der höheren Wirbeltiere (Vögel, Säuger) besteht aus zwei wohl definierbaren Abschnitten (Abb. 26I—IV), die verschieden stark zusammenhängen können: 1. aus einer lückenlos gefügten, mehrreihigen ependymalen Formation und 2. aus einem locker angeordneten, sezernierenden Hypendym (Krabbe 1925). Im Gegensatz zu dem in der Organisation relativ konstanten ependymalen SKO, kann die hypendymale Formation sehr unterschiedlich ausgeprägt sein. Sie wird bei manchen Wirbeltieren vollkommen vermißt, erreicht aber bei anderen eine sehr starke Ausbildung, die durch die hohe Zahl sekretorisch aktiver Zellen gekennzeichnet ist. Der hypendymale Zellverband kann der eingenommenen Fläche nach das ependymale SKO sogar übertreffen (Rind; Abb. 26, IVc) und weitgehend verselbständigt werden. Die Ependymfortsätze der basalen Zellreihe sind bei adulten Säugern in der Regel zurückgebildet oder zumindest stark verkürzt (Rhesusaffe, s. Abb. 21, 26IVa). Im SKO einiger Säugerarten werden die peripheren Verbindungsstränge, die zur äußeren Grenzmembran ziehen, von Ketten bipolarer Gliazellen gebildet, die entweder mit dem ependymalen Verband oder mit den hypendymalen Zellformationen zusammenhängen (Rind). Bei manchen Säugern finden sich an einem Objekt beide Möglichkeiten

(neugeborene Katzen, Hund; s. Abb. 26 II, III). Neben den von einzelnen bipolaren Zellen (Kaninchen) und Ketten bipolarer Zellen gebildeten Strängen wurden noch breite, aus epithelialen Zellen bestehende Verbände (Hund, rostraler Teil des SKO) beobachtet.

In den übereinandergetürmten, nicht mehr zusammenhängenden Epithelrosetten, -schläuchen und Zellhaufen (Rind) kann eine noch weiter gehende Spezialisierung und Verselbständigung solcher Zellstraßen erblickt werden. Da diese sezernierenden Strukturen stets auf die Gefäße ausgerichtet sind, müssen sie eine besondere funktionelle Bedeutung haben.

Unter subkommissuralem Hypendym verstehe ich alle sekretorisch aktiven Zellen des SKO, die nicht mehr innerhalb des ursprünglichen ependymalen Zellverbandes liegen. Diese Zellen gehen entweder aus einzelnen bzw. kettenartig angeordneten, aus dem ependymalen Zellverband ausgewanderten Zellen hervor, oder sie werden als ganze Zellverbände, im Zusammenhang von der Basis des SKO abgetrennt. Der erste Modus führt zur Entstehung diffus verteilter sekretorischer Gliazellen von bipolarem oder multipolarem Charakter, der zweite zu hypendymalen Zellinseln, die vorwiegend aus epithelähnlichen Zellen bestehen.

c) Gliacharakter des sekretorischen Parenchyms im Subkommissuralorgan

Es war besonder wichtig, zu klären, ob die sekretorisch aktiven Zellen des SKO als modifizierte Nerven- oder Gliazellen aufzufassen sind. Nach der Zellform (Tanycyten, sowie aus dem ependymalen Zellverband ausgewanderte unipolare, bipolare, multipolare und abgerundete Elemente) handelte es sich um Zellen, die zur Formenreihe der Glia gehören (Abb. 15, 17d, 19b, 26).

Dieser Eindruck mußte aber durch spezifische neurohistologische Methoden gesichert werden. In den Kapiteln über das SKO des Grasfrosches und der Katze wurde bereits darauf hingewiesen, daß diese Zellen keine für ein Neuron charakteristischen Merkmale (Nissl-Substanz, Neurofibrillen) aufweisen. Ihre Feinstruktur ließ sich am besten mit der Molybdänhämatoxylin-Methode (Held) darstellen. Für die gliöse Natur sprechen weiterhin die endfußartigen Differenzierungen, die diese Zellen an den Grenzmembranen ausbilden.

Das Subkommissuralorgan ist ein epithalamisches sekretorisches Gliaorgan, das man den neurosekretorischen Kerngebieten des Hypothalamus gegenüberstellen kann.

d) Progressive und regressive Entwicklung des Wirbeltier-Subkommissuralorgans

An vielen Gehirnen mit einer starken Comm. post. fiel es auf, daß in dem rostralen, dünnwandigen Abschnitt des SKO die Gefäßbeziehungen durch bipolare, mit dem ependymalen Verband zusammenhängende Gliazellen hergestellt wurden, kaudal dagegen durch Zellverbände, die multipolare und epitheloide Zellen enthielten.

Das recht verschiedene Aussehen des Wirbeltier-SKO wird in erster Linie durch die verschiedenartige morphologische Differenzierung des Hypendyms geprägt und weniger durch die Höhe des ependymalen Verbandes bestimmt. Es fragt sich, ob in der morphologischen Organisation des SKO ein durch die ganze Wirbeltierreihe verfolgbares, phylogenetisches Prinzip zu erkennen ist,

oder ob seine Gestalt bei den einzelnen Formen nur von der Dicke und der allgemeinen Differenzierung der Ventrikelwand abhängt.

Das SKO niederer Wirbeltiere hat durch die oft gut ausgebildeten Ependymfortsätze einen primitiveren ependymalen Charakter als das epitheliale SKO der Säuger. Außerdem nimmt das SKO niederer Wirbeltiere sowie embryonaler Sauropsiden *(Chalcides ocellatus, Anguis fragilis)* und Säuger (Maus) meist ein im Verhältnis zur ganzen Ependymfläche größeres Flächenareal ein als das SKO geschlechtsreifer Vertreter derselben Arten. Es kann aber nicht generell gesagt werden, daß das SKO der Säuger funktionell inaktiver wäre als das SKO niederer Wirbeltiere, wenn auch unter niederen Wirbeltieren ein niedriges, sekretarmes SKO seltener anzutreffen ist als bei Säugern.

Die sehr verschiedene Ausbildung des SKO innerhalb einer und derselben Ordnung war auch an den hier untersuchten Arten der *Rodentia* und an den zwei Arten der *Carnivora* deutlich. Dasselbe gilt auch für die von uns untersuchten *Teleostei*. Gewiß, das SKO der Molche, Anuren und Eidechsen hat einen für die betreffende Ordnung typischen Bau. Es kommen aber hier erhebliche Unterschiede in der Sekretmenge vor. So ist das SKO der *Rana esculenta* im Vergleich zur *Rana temporaria* auffallend sekretarm.

Es besteht aber eine Beziehung zwischen der sekretorischen Aktivität des SKO und dem Differenzierungsgrad der peripheren Zellstraßen und der hypendymalen Zellverbände. Wurden diese Strukturen nach Rückbildung der basalen Ependymfortsätze nicht ausdifferenziert, so kam es zu einer regressiven Entwicklung des ganzen SKO (*Chalcides ocellatus*, Maus). Die Rückbildung der Ependymfortsätze hängt wiederum von der Dicke der Ventrikelwand ab. Je dicker die Ventrikelwand, um so stärker treten höher differenzierte Gliazellen in Erscheinung. Sekrethaltige, in Ketten angeordnete hypendymale Gliazellen vom bipolaren Typ können bereits im dickwandigen Abschnitt des Cyclostomen-SKO vorkommen *(Petromyzon fluviatilis, Ammocoetes)*.

Bei *Bufo bufo* finden sich unter dem Ependym des SKO sogar sternförmige Gliazellen. Es gibt kein allgemeingültiges Maß der Dicke der Ventrikelwand, die die Rückbildung der Ependymfortsätze zur Folge hat. So ist die das SKO bedeckende Ventrikelwand bei adulten Hunden wesentlich höher als bei adulten Mäusen (s. Abb. 26) oder Meerschweinchen. Trotzdem verfügt das SKO der Hunde, im Gegensatz zu Maus und Meerschweinchen, über zahlreiche zu den Grenzmembranen strebende Zellfortsätze. An einem und demselben SKO findet man aber stets in dem dünnwandigen rostralen Bereich primitivere Strukturverhältnisse als weiter kaudal, wo der Wulst der Comm. post. die Wand um ein Beträchtliches verdickt.

Im Bereich eines funktionstüchtigen SKO mit gut ausgebildeter und sekretorisch aktiver ependymaler und hypendymaler Zellformation fehlt, ähnlich wie an der adeno-neurohypophysären Kontaktfläche (s. Spatz 1954), die innere Gliafaserdeckschicht (Niessing, persönliche Mitteilung). Dadurch soll der Stoffaustausch erleichtert werden (Spatz 1954, 1954/55).

Feldberg und Fleischhauer (1960) und Fleischhauer (1960) weisen aber darauf hin, daß der Farbstoff Bromphenolblau vom Liquor in die Ventrikelwand gerade da langsam und wenig eindringt, wo eine deutlich abgrenzbare subependymale Gliafaserschicht fehlt. Zur Zeit ist eine allgemeingültige Aussage über die funktionelle Bedeutung der inneren Gliafaserdeckschicht für den Stoffaustausch zwischen Liquor und Gehirn noch nicht möglich.

Bei Tieren mit einem stark zurückgebildeten SKO (17jähriger Schimpanse, Material Prof. Hofer, vgl. S. 594) tritt die nach Holzer darstellbare innere Gliafaserdeckschicht in Erscheinung. Sie ist am stärksten an den Stellen, wo das Ependym seine sekretorische Sonderdifferenzierung am weitesten eingebüßt hat.

Dort, wo in der Entwicklung vorhandenes subkommissurales Parenchym (Tanycytenfortsätze, Zellketten, Zellstraßen) zugrunde gegangen ist, findet man im adulten Zustand Gliafasern. Neben Gliafaserbündeln, in die Astrocyten eingestreut sind (Rhesusaffe, Abb. 26IVa) können in solchen Fällen auch zellfreie Gliafaserbündel (erwachsener Mensch, Abb. 25a, 26IVd) vorkommen.

Zusammenfassung

1. Untersucht wurden 344 lückenlose Serien des *Subkommissuralorgans* (Vertreter von 60 Wirbeltierarten aller Klassen). Das Subkommissuralorgan stellt eine charakteristische, wenn auch von Art zu Art unterschiedliche Differenzierung des Wirbeltiergehirns dar.

2. Die *Drüsennatur* des Subkommissuralorgans und seine *polare Differenzierung* konnten deutlich nachgewiesen werden. Dabei bewährte sich als Modell das einfach gebaute Subkommissuralorgan der Anuren *(Rana temporaria)*.

3. Das Subkommissuralorgan bildet ein mit Chromalaunhämatoxylin oder Paraldehydfuchsin elektiv färbbares *Sekret* vom Charakter eines Mucoproteids (bzw. Glykoproteids) oder eines Mucopolysaccharid-Eiweißkomplexes. Dieses Sekret wird von der ventrikelnahen epithelialen Zellreihe in den strömenden Ventrikelliquor abgesondert, wo es bei Fixierung zum Reissnerschen Faden gerinnt. Die basale Zellreihe mit ausgeprägten Gliocyten (Tanycyten) ist dagegen auf die gliösen Grenzmembranen ausgerichtet. Sekrethaltige Endfüße solcher Zellen wurden am Ufer der Gefäße und am Ufer der von den weichen Hirnhäuten begrenzten Liquorräume beobachtet. Den Gefäßbeziehungen der sekrethaltigen Gliazellen des Subkommissuralorgans kommt offensichtlich keine geringere Bedeutung zu als der Sekretion in den strömenden Liquor.

4. Mit der Dickenzunahme des Ventrikeldaches wandern zunehmend basale subkommissurale Ependymzellen aus. Diese extraependymalen Zellen haben den Charakter von Gliazellen. Sie haben ihre sekretorischen Potenzen nicht eingebüßt und fallen durch die besonders engen Gefäßbeziehungen auf. Ihre Fortsätze ersetzen die Zellausläufer der basalen ependymalen Tanycyten. Die vom Ependymverband des Subkommissuralorgans losgelösten gliösen Zellformationen bezeichnen wir mit Krabbe als *Hypendym*.

5. Der *ependymale* und *hypendymale* Zellverband des Subkommissuralorgans sind als eine Leistungsgemeinschaft aufzufassen. Die beiden Komponenten dieses Komplexes können morphologisch sehr verschieden ausgeprägt sein.

6. Das Subkommissuralorgan zeigt in der Ontogenese bei einigen Arten eine *progressive*, bei anderen wieder eine *regressive* Entwicklung.

Ein *sekretorisch aktives* Subkommissuralorgan zeichnet sich in der Regel entweder durch kräftige basale Ependymfortsätze oder durch eine gut ausgebildete hypendymale Zellformation mit Gefäßbeziehungen aus.

Die *regressive Entwicklung* wird gekennzeichnet durch Abnahme der Epithelhöhe im ependymalen Zellverband und durch Rückbildung der basalen Gefäßbeziehungen; eine ausgeprägte hypendymale Zellformation fehlt.

Häufig kann man feststellen, daß die in der Ontogenese erfolgende Umgestaltung des Subkommissuralorgans mit der Verstärkung der Commissura posterior, die zur Verdickung der Ventrikelwand führt, zusammenhängt. Eine phylogenetische Regel läßt sich hier nicht aufstellen.

7. Das Subkommissuralorgan 70—135 mm langer *menschlicher* Embryonen ist nicht nur morphologisch voll differenziert, sondern enthält auch den typischen elektiv färbbaren Sekretstoff. Beim Erwachsenen dagegen kommen nur noch vereinzelte inselartige Überreste des Subkommissuralorgans vor, die im ependymalen Zellverband liegen und cytologisch inaktiv sind.

8. Besonders wesentlich erscheint, daß die Zellen des *Subkommissuralorgans* sowohl der Differenzierung als auch der Feinstruktur nach zur *Formenreihe der Glia* gehören. Innerhalb dieser nehmen sie mit ihrer ausgeprägten *sekretorischen Aktivität* eine ähnliche *Sonderstellung* ein, wie etwa die neurosekretorischen Nervenzellen unter anderen Neuronen. Die Tatsache, daß ein eng begrenztes Ependym- und Gliaareal im Gegensatz zu anderen Zellen des gleichen morphologischen Typs so stark sezerniert, ist ein so auffallendes Phänomen, daß es bei funktionellen Überlegungen nicht übersehen werden darf.

Literatur

Adam, H.: Kugelförmige Pigmentzellen als Anzeiger der Liquorströmung in den Gehirnventrikeln von Krallenfroschlarven. Z. Naturforsch. 8b, 250—258 (1953).

— Beitrag zur Kenntnis der Hirnventrikel und des Ependyms bei Cyclostomen. Verh. anat. Ges. (Jena) **53**, 173—188 (1957).

Afzelius, B. A., and R. Olsson: The fine structure of the subcommissural cells and of Reissner's fibre in *Myxine*. Z. Zellforsch. **46**, 672—685 (1957).

Agduhr, E.: Chorioid plexus and ependyma, p. 537—575. In Penfield, Cytology and cellular pathology of the nervous system. New York: Hoeber 1932.

Arvy, L., H. Fontaine et M. Gabe: Modifications histologiques de l'organe sous-commissural au cours du cycle évolutif de *Salmo salar* L. Arch. Anat. micr. Morph. exp. **44**, 313—322 (1955).

Bargmann, W.: Epiphyse. In Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. VI/1. Berlin: Springer 1943.

— Über die neurosekretorische Verknüpfung von Hypothalamus und Neurohypophyse. Z. Zellforsch. **34**, 610—634 (1949).

— Das Zwischenhirn-Hypophysensystem. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1954.

— Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, 3. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme 1959.

—, u. Th. H. Schiebler: Histologische und cytochemische Untersuchungen am Subcommissuralorgan von Säugern. Z. Zellforsch. **37**, 583—596 (1952).

Bauer-Jokl, M.: Über das sogenannte Subcommissuralorgan. Arb. neurol. Inst. Univ. Wien **22**, 41—79 (1919).

Bosque, G., B. Arranz et S. Arnaiz: L'organe sous-commissural chez *Cavia cobaya* adulte. Acta anat. (Basel) **33**, 65—75 (1958).

Carlisle, D. B.: Neurosecretory transport in the pituitary stalk of *Lophius piscatorius*. 2. Internat. Symposium über Neurosekretion, Lund 1957, S. 18—19. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958.

Christ, J., Fr. Engelhardt u. R. Diepen: Über Begleiterscheinungen der Neurosekretion im Silberbild. 2. Internat. Symposium über Neurosekretion, Lund 1957, S. 30—41. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958.

Clara, M.: Das Nervensystem des Menschen, 2. Aufl. Leipzig: Johann Ambrosius Barth 1953.

Dawson, A. B.: Evidence for the termination of neurosecretory fibers within the pars intermedia of the hypophysis of the frog, *Rana pipiens*. Anat. Rec. **115**, 63—70 (1953).

Dendy, A.: On the parietal sense organs and associated structures in the New Zealand Lamprey. Quart. J. micr. Sci. **51**, 1—29 (1907).
—, and G. E. Nichols: On the occurrence of a mesocoelic recess in the human brain, and its relation to the subcommissural organ of lower vertebrates; with special reference to the distribution of Reissner's fibre in the vertebrate series and its possible function. Anat. Anz. **37**, 496—508 (1910).
Enami, M.: Studies in neurosecretion. I. Preoptico-subcommissural neurosecretory system in the eel *(Anguilla japonica)*. Endocr. jap. **1**, 133—145 (1954).
Feldberg, W., and K. Fleischhauer: Penetration of bromophenol blue from perfused cerebral ventricles into the brain tissue. J. Physiol. (Lond.) **150**, 451—462 (1960).
Fleischhauer, K.: Untersuchungen am Ependym des Zwischen- und Mittelhirns der Landschildkröte *(Testudo graeca)*. Z. Zellforsch. **46**, 729—767 (1957).
— Über die Feinstruktur der Faserglia. Z. Zellforsch. **47**, 548—566 (1958).
— Fluorescenzmikroskopische Untersuchungen an der Faserglia. I. Beobachtungen an den Wandungen der Hirnventrikel der Katze (Seitenventrikel, III. Ventrikel). Z. Zellforsch. **51**, 467—496 (1960).
Fridberg, G., and R. Olsson: The praeoptico-hypophysial system, nucleus tuberis lateralis and the subcommissural organ of *Gasterosteus aculeatus* after changes in osmotic stimuli. Z. Zellforsch. **49**, 531—540 (1959).
Gilbert, G. J.: The subcommissural organ. Anat. Rec. **126**, 253—265 (1956).
— The subcommissural organ: a regulator of thirst. Amer. J. Physiol. **191**, 243—247 (1957).
— Subcommissural organ secretion in the dehydrated rat. Anat. Rec. **158**, 563—567 (1958).
Goslar, H. G.: Ein Beitrag zur elektiven Darstellung der Keratine und zum histochemischen Verhalten anderer Disulfidverbindungen in der Haut. Acta histochem. (Jena) **5**, 39—48 (1957).
Graumann, W.: Zur Standardisierung des Schiffschen Reagens. Z. wiss. Mikr. **61**, 225—226 (1953).
Grignon, G.: Développement du complexe hypothalamo-hypophysaire chez l'embryon de poulet. Nancy: Société d'impressions typographiques 1956.
Harms, J. W.: Individualzyklen als Grundlage für die Erforschung des biologischen Geschehens. Berlin: Dtsch. Verlagsgesellschaft für Politik u. Geschichte 1924.
Hild, W.: Das morphologische, kinetische und endokrinologische Verhalten von hypothalamischen und neurohypophysärem Gewebe in vitro. Z. Zellforsch. **40**, 257—312 (1954).
Hochstetter, F.: Über die Entwicklung der Zirbeldrüse des Menschen. Anat. Anz. **54**, Erg.-Bd., 193—198 (1921).
— Beiträge zur Entwicklungsgeschichte des menschlichen Gehirns. Wien u. Leipzig 1929.
Hofer, H.: Zur Morphologie der circumventrikulären Organe des Zwischenhirnes der Säugetiere. Verh. der Dtsch. Zool. Ges., Frankfurt, 202—251 (1958).
— Über das Infundibularorgan und den Reissnerschen Faden von *Branchyostoma lanceolatum*. Zool. Jb. Abt. Anat. Ontog. **77**, 465—490 (1959).
Holmgren, U.: On the structure of the pineal area of teleost fishes. Göteborgs Kgl. Vetenskaps-Vitterhets-Sämhall. Handl. Sjätte Földjen, Ser. B 8, 1—66 (1959).
Horstmann, E.: Die Faserglia des Selachiergehirns. Z. Zellforsch. **39**, 588—617 (1954).
Kappers, J. Ariëns: On the presence of periodic acid Schiff positive substances in the paraphysis cerebri, the choroid plexuses and the neuroglia of *Amblystoma mexicanum*. Experientia (Basel) **12**, 187—188 (1956).
— The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. Z. Zellforsch. **52**, 163—215 (1960).
Kelly, D. E., and J. C. van de Kamer: Cytological and histochemical investigations on the pineal organ of the adult frog *(Rana esculenta)*. Z. Zellforsch. **52**, 618—639 (1960).
Kolmer, W.: Das „Sagittalorgan" der Wirbeltiere. Z. Anat. Entwickl.-Gesch. **60**, 652—717 (1921).
Krabbe, K. H.: L'organe sous-commissural du cerveau chez les mammifères. Kgl. danske Vid. Selsk. biol. Medd. **5**, Nr 4, 1—83 (1925).
— Sur l'embryologie et ses relations avec la pathologie. Copenhagen: Munksgaard 1953.
Landau, E.: L'organe sous-commissural. Acta anat. (Basel) **41**, 156—160 (1960).

Legait, E.: Les organes épendymaires du troisième ventricule. Thèse Méd. Nancy: G. Thomas 1942.
— L'organe sous-commissural chez la Grenouille normale et hypophysoprivé. C. R. Soc. Biol. (Paris) **140**, 543—545 (1946).
— Le rôle de l'épendyme dans les phénomènes endocrines du diencéphale. Bull. Soc. Sci. Nancy **1**, 1—12 (1949).
Leuchtenberger, C.: A cytochemical study of pycnotic nuclear degeneration. Chromosoma (Berl.) **3**, 449—473 (1950).
Lieber, A.: Vorschläge zu biologisch einwandfreier Haltung von Anuren zu Laboratoriumsversuchen. Z. Geburtsh. u. Frauenheilk. **12**, 1086—1088 (1954).
Marburg, O.: Neue Studien über die Zirbeldrüse. Arb. neurol. Inst. Univ. Wien **23**, 1—35 (1922).
Mazzi, V.: Caratteri secretori nelle cellule dell'organo sottocommissurale dei Vertebrati inferiori. Arch. Zool. ital. **37**, 445—464 (1952).
— Alcune osservazioni intorno al sistema neurosecretorio ipotalamo-ipofisario e all'organo sottocommissurale nell'ontogenesi di *Rana agilis*. Monit. zool. ital. **62**, 78—82 (1954).
McManus, J. F. A., and J. C. Cason: Carbohydrate histochemistry studies by acetylation techniques. I. Periodic acid methods. J. exp. Med. **91**, 651—654 (1950).
Murakami, M., F. Ban u. S. Aiura: Über die histologische Studie des Subkommissuralorgans des *Gecko japonicus*. Kurume med. J. **4**, 8—17 (1957).
Okada, M.: On the secretory pathway of the subcommissural organ. Arch. Hist. Jap. **9**, 199—204 (1955).
Oksche, A.: Über die Art und Bedeutung sekretorischer Zelltätigkeit in der Zirbel und im Subkommissuralorgan. Verh. anat. Ges. (Jena) **52**, 88—96 (1954).
— Untersuchungen über die Nervenzellen und Nervenverbindungen des Stirnorgans, der Epiphyse und des Subkommissuralorgans bei anuren Amphibien. Morph. Jb. **95**, 393—425 (1955).
— Funktionelle histologische Untersuchungen über die Organe des Zwischenhirndaches der Chordaten. Anat. Anz. **102**, 404—419 (1956).
— Die Bedeutung des Ependyms für den Stoffaustausch zwischen Liquor und Gehirn. Verh. anat. Ges. (Jena) **53**, 162—172 (1957).
— Histologische Untersuchungen über die Bedeutung des Ependyms, der Glia und der Plexus chorioidei für den Kohlenhydratstoffwechsel des ZNS. Z. Zellforsch. **48**, 74—129 (1958a).
— Diskussionsbemerkung zu H. Hofer, Verh. der Dtsch. Zool. Ges. 1958b, S. 241[1].
— Studien am Subkommissuralorgan. Verh. anat. Ges. (Jena) **56**, 392—404 (1959/60).
— Über die sekretorische Tätigkeit des Zwischenhirndaches. Klin. Wschr. **38**, 462—463 (1960).
Olsson, R.: Structure and development of Reissner's fibre in the caudal end of Amphioxus and some lower vertebrates. Acta zool. (Stockh.) **36**, 167—198 (1955).
— The development of Reissner's fibre in the brain of the salmon. Acta zool. (Stockh.) **37**, 235—250 (1956).
— An experimental breakage of Reissner's fibre in the central canal of the pike *(Esox lucius)*. Z. Zellforsch. **46**, 12—17 (1957).
— Studies on the subcommissural organ. Acta zool. (Stockh.) **39**, 71—102 (1958a).
— The subcommissural organ. Stockholm 1958b.
—, and K. G. Wingstrand: Reissner's fibre and the infundibular organ in Amphioxus-results obtained with Gomori's chrome alum haematoxylin. Univ. Bergen Årbok (Publ. Biol. Stat.) **14**, 1—14 (1954).
Opalski, A.: Über lokale Unterschiede im Bau der Ventrikelwände beim Menschen. Z. ges. Neurol. Psychiat. **149**, 221—254 (1934).
Pearse, A. G. E.: Histochemistry. London: Churchill 1953.
Penfield, W.: Neuroglia: normal and pathological. In W. Penfield, Cytology and cellular pathology of the nervous system, vol. II, p. 423—479. New York: Hoeber 1932.

[1] Druckfehler-Berichtigung: In der neunten Zeile muß es anstatt „wesentlichen Wuchsstoffes" — „wesentlichen Wirkstoffes" heißen.

Pesonen, N.: Über das Subkommissuralorgan beim Meerschweinchen. Acta Soc. Med. „Duodecim", Ser. A **22**, 53—78 (1940).
– Über das Subkommissuralorgan beim Menschen. Acta Soc. Med. „Duodecim", Ser. A **22**, 79—114 (1940).
Pesonen, N., u. K. Setälä: Über die mit dem Subkommissuralorgan zusammenhängende Zellanhäufung. Acta Soc. Med. „Duodecim", Ser. A **23**, 46—58 (1940).
Puusepp, L., u. H. E. V. Voss: Studien über das Subcommissuralorgan. I. Das Subcommissuralorgan beim Menschen. Fol. neuropath. eston. **2**, 13—21 (1924).
Reichold, S.: Untersuchungen über die Morphologie des subfornikalen und subkommissuralen Organs bei Säugetieren und Sauropsiden. Z. mikr.-anat. Forsch. **52**, 455—479 (1942).
Riech, F.: Epiphyse und Paraphyse im Lebenszyklus der Anuren. Z. vergl. Physiol. **2**, 524—570 (1925).
Romeis, B.: Mikroskopische Technik. München: Leibniz 1948.
Sano, Y., u. F. Hartmann: Über Durchschneidungsversuche am kaudalen neurosekretorischen System von *Tinca vulgaris* (mit Berücksichtigung des Reissnerschen Fadens). Z. Zellforsch. **50**, 415—424 (1959).
Scharrer, E.: Neurosecretion. X. A relationship between the paraphysis and the paraventricular nucleus in the garter snake *(Thamnophis sp.)*. Biol. Bull. **101**, 106—113 (1951).
— and B.: Hormones produced by neurosecretory cells. Recent Progr. Hormone Res. **10**, 183—240 (1954a).
— Neurosekretion. In Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. 6, Teil 5, S. 953—1066. 1954b.
Schmidt, E. S. G.: Der Einfluß des Winterschlafes, des Megaphenschlafes, des Hungerns und verschiedener Kostarten auf die Speicheldrüsen von *Myoxus myoxus*, *Erinaceus europaeus* und *Mus rattus*. Z. Zellforsch. **50**, 143—182 (1959).
Schubert, G.: Die Aktivität von Hypophyse, Thyreoidea, Epiphyse und ihre Beeinflussung durch Parahydroxypropiophenon, Östradiol und Testosteron während der Larvalentwicklung von *Bufo bufo* L. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. **150**, 1—47 (1957).
Shimizu, N., and T. Kumamoto: Histochemical studies on the glycogen of the mammalian brain. Anat. Rec. **114**, 479—498 (1952).
Sklower, A.: Das inkretorische System im Lebenscyklus der Frösche (*Rana temporaria* L.). Z. vergl. Physiol. **2**, 474—523 (1925).
Spatz, H.: Das Hypophysen-Hypothalamus-System in seiner Bedeutung für die Fortpflanzung. Verh. anat. Ges. (Jena) **51**, 46—86 (1954).
— Diskussionsbemerkung zu A. Oksche. Verh. anat. Ges. (Jena) **52**, 96 (1954/55).
— Die proximale (supraselläre) Hypophyse, ihre Beziehungen zum Diencephalon und ihre Regenerationspotenz, S. 53—77. Pathophysiologia Diencephalica. Internat. Symposion, Mailand, 1956. Wien: Springer 1958.
Stutinsky, F.: Colloide, corps de Herring et substance gomori-positive de la neurohypophyse. C. R. Soc. Biol. (Paris) **144**, 1357—1360 (1950).
— La neuro-sécrétion chez l'Anguille normale et hypophysectomisée. Z. Zellforsch. **39**, 276—297 (1953).
Talanti, S.: Studies on the subcommissural organ in some domestic animals. Ann. med. exp. Fenn. **36**, Suppl. 9, 1—97 (1958).
— Studies on the subcommissural organ of the bovine fetus. Anat. Rec. **134**, 473—490 (1959).
—, and E. Kivalo: Studies on the subcommissural organ of some ruminants. Anat. Anz. **108**, 53—59 (1960).
Turkewitsch, N.: Die Entwicklung der Zirbeldrüse des Menschen. Morph. Jb. **72**, 379—445 (1933).
— Die Entwicklung des subkommissuralen Organs beim Rind (*Bos taurus* L.). Morph. Jb. **77**, 573—586 (1936).
Vonwiller, P., u. R. R. Wigodskaja: Mikroskopische Beobachtung der Bewegung des Liquors im lebenden Gehirn. Z. Anat. **102**, 290—297 (1934).
Wingstrand, K. G.: Neurosecretion and antidiuretic activity in chick embryos with remarks on the subcommissural organ. Ark. Zool. (Stockh.) **6**, 41—67 (1953).

Wislocki, G. B., and E. H. Leduc: The cytology and histochemistry of the subcommissural organ and Reissner's fiber in the rodents. J. comp. Neurol. **97**, 515—543 (1952b).
— The cytology of the subcommissural organ, Reissner's fiber, periventricular glial cells and posterior collicular recess of the rat's brain. J. comp. Neurol. **101**, 283—310 (1954).
— and A. J. Mitchell: On the ending of Reissner's fiber in the filum terminale of the spinal cord. J. comp. Neurol. **104**, 493—517 (1956).
—, and W. D. Roth: Selective staining of the human subcommissural organ. Anat. Rec. **130**, 125—130 (1958).

Privatdozent Dr. A. Oksche, Anatomisches Institut der Universität, Kiel, Neue Universität, Eingang F 1

Zeitschrift für Zellforschung 54, 613—630 (1961)

From the Zoological Institute of the University of Kyoto (Japan)
(Director: Prof. Dr. M. Ichikawa)

ELECTRON MICROSCOPIC STUDIES ON THE NEUROSECRETORY SYSTEM IN LEPIDOPTERA

By

J. Nishiitsutsuji-Uwo*

With 12 Figures in the Text

(Received December 28, 1960)

Introduction

Since Weyer (1935) first observed nerve cells having a secretory activity in the brain of the honey-bee, *Apis mellifica*, neurosecretory cells have been discovered in the nervous system, especially in the pars intercerebralis of the brain of insects belonging to different orders. B. and E. Scharrer (1944) have advocated from their comprehensive studies that the hypothalamo-hypophyseal system in vertebrates is comparable in morphology to the intercerebralis-cardiacum-allatum system in insects. In *Leucophaea*, the secretory material can be traced from the perikaryon via axon to the corpus cardiacum. The latter serves as a storage center of the neurosecretory material (B. Scharrer 1952). This finding has been corroborated subsequently in different species of insects. Our experimental results in Lepidopterans favor the view of transportation of the secretory material. However, the major storage center for neurosecretory material is the corpus allatum; the corpus cardiacum plays, if any, a minor role in this respect (Ichikawa and Nishiitsutsuji-Uwo 1959, 1960; Ichikawa and Takahashi 1959).

In our studies the neurosecretory material proved less stainable than in representatives of other orders (unpublished data). Therefore, the electron microscopic approach was chosen to elucidate the intercerebralis-cardiaca-allata system. The present paper records observations on the secretory activity in the perikaryons of neurosecretory cells and on the transport and release of the secretory product.

Materials and Methods

The tissues used in the present work are the brain-cardiaca-allata complexes of both the domestic silkworm, *Bombyx mori* and the Eri-silkworm, *Philosamia cynthia ricini*. In the mature stage of the last instar of these caterpillars the heads were cut off and the brain-cardiaca-allata complexes were immediately dissected out and fixed. The fixation was carried

* The author wishes to express her cordial thank to Prof. Dr. M. Ichikawa, under whose supervision the present investigation was performed. She is also indebted to Prof. Dr. Y. Sano of the Anatomical Institute, Kyoto Prefectural Medical College, for his valuable criticism of the electron micrographs.

Thanks are also due to Prof. Dr. G. Yasuzumi and other members of the Electron Microscope Research Laboratory, Nara Medical College, as well as to the members of the Electron Microscope Laboratory of Keio-University, for their technical assistance in taking the micrographs.

And last but not least, she wishes to acknowledge her indebtedness to Prof. Dr. M. Shigenaga of the Nara Women's University and to Prof. Dr. N. Shinke of the University of Kyoto for their kind aid in the preparation of the electron microscopic sections.

out in the case of *Bombyx* at 10° C for 30 minutes in 1 per cent osmium tetroxide solution adjusted to pH 7.0 with veronal-acetate buffer. Thereafter, without washing in distilled water, the specimens were rapidly dehydrated in a graded series of ethanol (Yasuzumi and Ishida 1957), impregnated with a mixture of 20 per cent methyl and 80 per cent *n*-butyl methacrylate, and finally embedded in the same resin mixture using 1 per cent 2,6-dichlorobenzoyl peroxide as catalyst for polymerization at 40° C. In the case of *Philosamia*, the materials were fixed at 5° C for 90 minutes in a mixture composed of 1 per cent osmium tetroxide, 0.22 M. sucrose and 1 per cent dextran, buffered with phosphate solution at pH 7.0 (Bahr, Bloom and Friberg 1957). After dehydration in a graded series of butanol, the specimens were embedded in a mixture of 75 per cent *n*-butyl and 25 per cent methyl methacrylate, using 0.2 per cent benzoyl peroxide as catalyst for polymerization at 65° C. Sections were mounted on grids coated with formvar and examined, without removing the resin, with the Akashi electron microscope, model TRS-50, or with the Hitachi electron microscope, model HS-5. Electron micrographs were taken at different magnifications ranging from 2200 to 12000, and enlarged photographically as desired.

For the light microscopic examination, the materials mentioned above were fixed in Bouin's solution for 24—48 hours. Serial sections were cut at 5 μ and stained with Gomori's chrome-alum-hematoxylin-phloxin.

Observations

I. Neurosecretory cell

In the mature larva, the neurosecretory cells are clearly found in the different parts of the brain. The medial groups of the cells are situated in the pars intercerebralis of the protocerebrum, each group consisting of two types of cells. One type consists of large ellipsoid or polygonal cells, measuring 30—40 μ in major diameter; their nucleus is round, about 10—15 μ in diameter. Cytoplasmic inclusions of these cells are generally stained light blue in Gomori's chrome-alum-hematoxylin-phloxin. Sometimes, a few granules with a tint of deep blue (about 1 μ in diameter) are found in the cytoplasm. Besides, a number of small vacuoles are present in the peripheral part of the cytoplasm in *Philosamia*. In *Bombyx* a large vacuole is seen at the opposite pole of the axon hillock. The other type are small round cells measuring 18—25 μ in diameter; cytoplasmic inclusions of these cells are sometimes stained deep red and sometimes deep blue in Gomori's staining. The neurosecretory material in the small cells has generally a fine granular appearance. Unfortunately, it was often impossible to distinguish the large cell from the small cell through the electron microscopic observations.

The lateral groups, consisting of a few neurosecretory cells each, are found in the lateral parts of the protocerebrum. In the present paper the description will be limited to the fine structures of the cells of the medial groups.

1. Nucleus. The nucleus is situated at the center of the cell and is, in general, round or oval, with irregular outline. As seen in Fig. 1, electron micrographs reveal that the nuclear membrane (*NM*) consists of two thin layers, the inner being thicker (about 100 Å) than the outer (about 70 Å). The outer layer carries fine granules, probably Palade granules. Sometimes, the outer layer is associated with membranes of the endoplasmic reticulum. Between the two layers a space is present (about 180 Å). Thus, the nuclear membrane as a whole is about 350 Å in thickness.

The nucleus contains many dense granules (100—250 Å), evenly distributed or aggregated into small clouds in a rather homogeneous matrix.

The nucleolus appears as a dark area, which is irregular in outline and comprises a few masses of fine dense granules connected with each other by filaments. Perhaps these granules and filamentous structures are equivalent to the

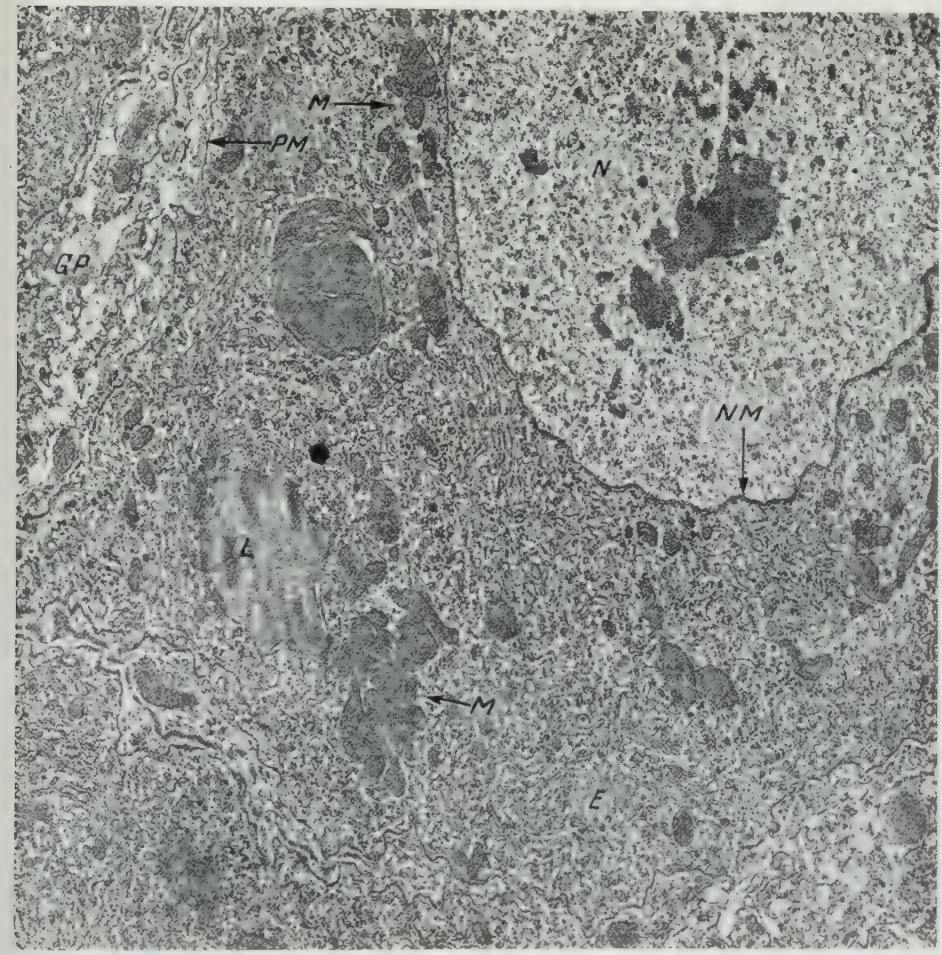


Fig. 1. Neurosecretory cell in the pars intercerebralis of *Philosamia*. This cell contains no neurosecretory granules, however, it is identified as the neurosecretory cell from its form, dimension, etc. Such neurosecretory cells are frequently encountered, especially in *Philosamia*. *N* Nucleus; *NM* Nuclear membrane; *M* Mitochondria; *L* Lipide body; *PM* Plasma membrane; *GP* Neuroglial cell processes; *E* Rough surfaced endoplasmic reticulum. Magnification: 14000 ×

"pars amorpha" and nucleolonema respectively found in varying cells of different animals as reported by Estable and Sotelo (1955) and Horstmann and Knoop (1957).

2. Perikaryon. The perikaryon of the neurosecretory cells in the pars intercerebralis harbors mitochondria, endoplasmic reticulum, the ribosomes, and the Golgi apparatus as seen in neurones in general. Besides, as a special feature of these cells, electron-dense granules are often seen. They are referred to as neurosecretory granules, details of which will be stated later.

a) Mitochondria. In the cytoplasm, there occur numerous filamentous, rod-like or sometimes bead-like mitochondria. They show a slightly greater density than the cytoplasmic matrix. The mitochondria distribute at random or sometimes gather together in crowds (*M* in Fig. 1). The mitochondria consist of double membranes and cristae. There seems no relationship between the mitochondria and the physiological activity of the cell.

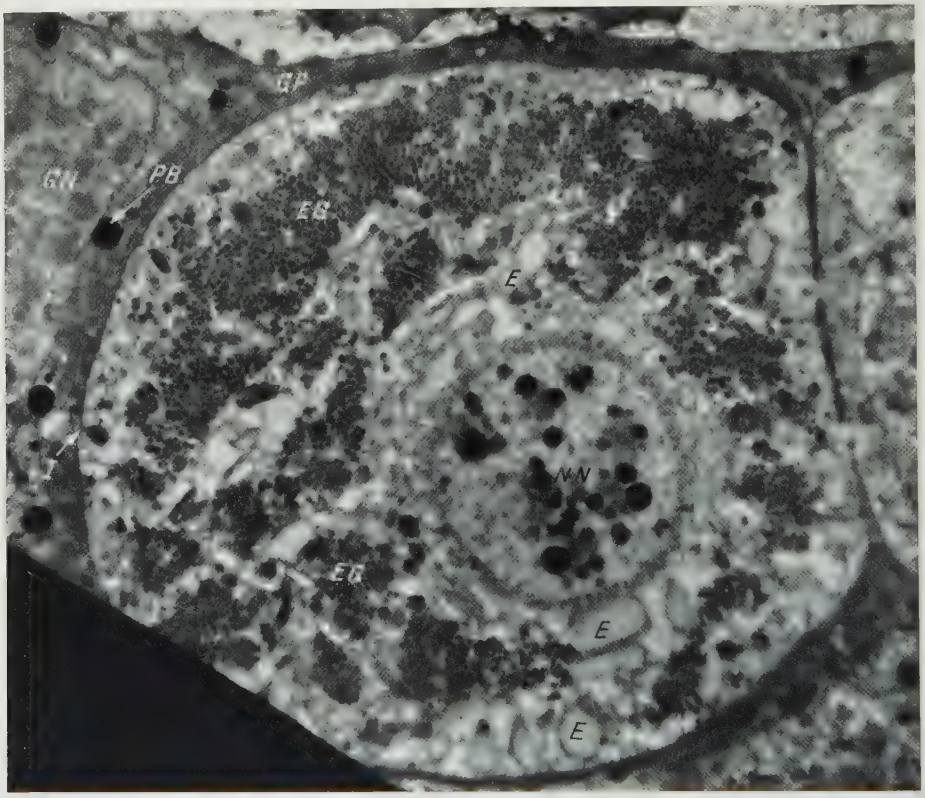


Fig. 2. Neurosecretory cell of *Bombyx* filled with neurosecretory elementary granules. *NN* Nucleus of the neurosecretory cell; *E* Endoplasmic reticulum; *EG* Elementary granule; *GN* Nucleus of the neuroglial cell; *GP* Neuroglial cell processes; *I* Invagination of neuroglial cell process; *PB* Pigment body. Magnification: 9000 ×

b) Endoplasmic reticulum and ribosomes. The cytoplasm of the neurosecretory cell is filled with endoplasmic reticulum (*E* in Fig. 1). Most of the membrane are rough-surfaced, but sometimes smooth-surfaced ones are also observed. Regardless of its surface structure the membrane is about 70 Å in thickness.

The ribosomes on the surface of the endoplasmic reticulum are similar, with respect to the size, 200 Å in diameter, and electron density, to Palade granules (Palade 1955). The same granules are also observed free in the cytoplasm.

Generally speaking, the rough surfaced cytomembranes are well-differentiated in cells with no or only few neurosecretory granules. By contrast, when neurosecretory granules are abundant in the cytoplasm of *Philosamia* few cytomembranes are seen (Fig. 4). In *Bombyx*, cells with many secretory granules

contain smooth-surfaced endoplasmic reticulum which seems to be of the tubular type (*E* in Fig. 2).

c) Golgi apparatus. A complex structure, consisting of piles of smooth double membranes and small vacuoles surrounding them, is frequently encountered in the cytoplasm (*G* in Figs. 3—5). This structure is referred to as the Golgi apparatus. It much resembles the Golgi apparatus found in the neurosecretory cells in

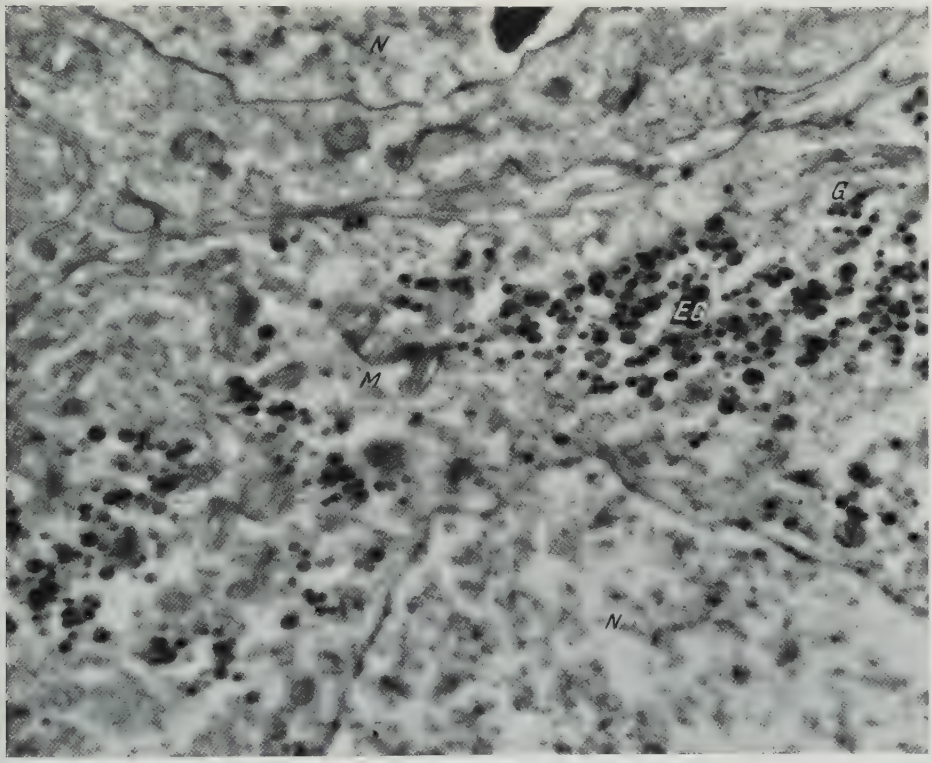


Fig. 3. Neurosecretory cell of *Bombyx* showing constricted mitochondria among the elementary granules. *M* Mitochondria; *G* Golgi lamellae; *EG* Elementary granule; *N* Nucleus. Magnification: 13300 ×

the caudal spinal cord of *Tinca vulgaris* (Sano and Knoop 1959). Each component of the double membranes is about 60 Å in thickness and the space between the two components is about 90 Å. The small vacuoles vary in size, and are filled with a homogeneous substance with less electron density than its membranous wall.

d) Neurosecretory granules. The most striking features often encountered in the neurosecretory cells are fine, spherical or ellipsoidal, electron-dense granules (*EG* in Figs. 2—5). These granules are relatively uniform in electron density, and each one is about 1000—3200 Å in longer diameter (1800 Å on the average) in *Philosamia*, while they measure about 600—3600 Å (1200 Å on the average) in *Bombyx*. From their form and dimension, these granules may be considered to be equivalent to the neurosecretory granules of the neurohypophysis (Bargmann 1958; Duncan 1956; Fujita 1957; Green 1955; Hartmann 1958; Palay

1957), in the caudal neurosecretory system of the vertebrates (Enami and Imai 1958; Sano and Knoop 1959) and in the neurosecretory terminal organs of the

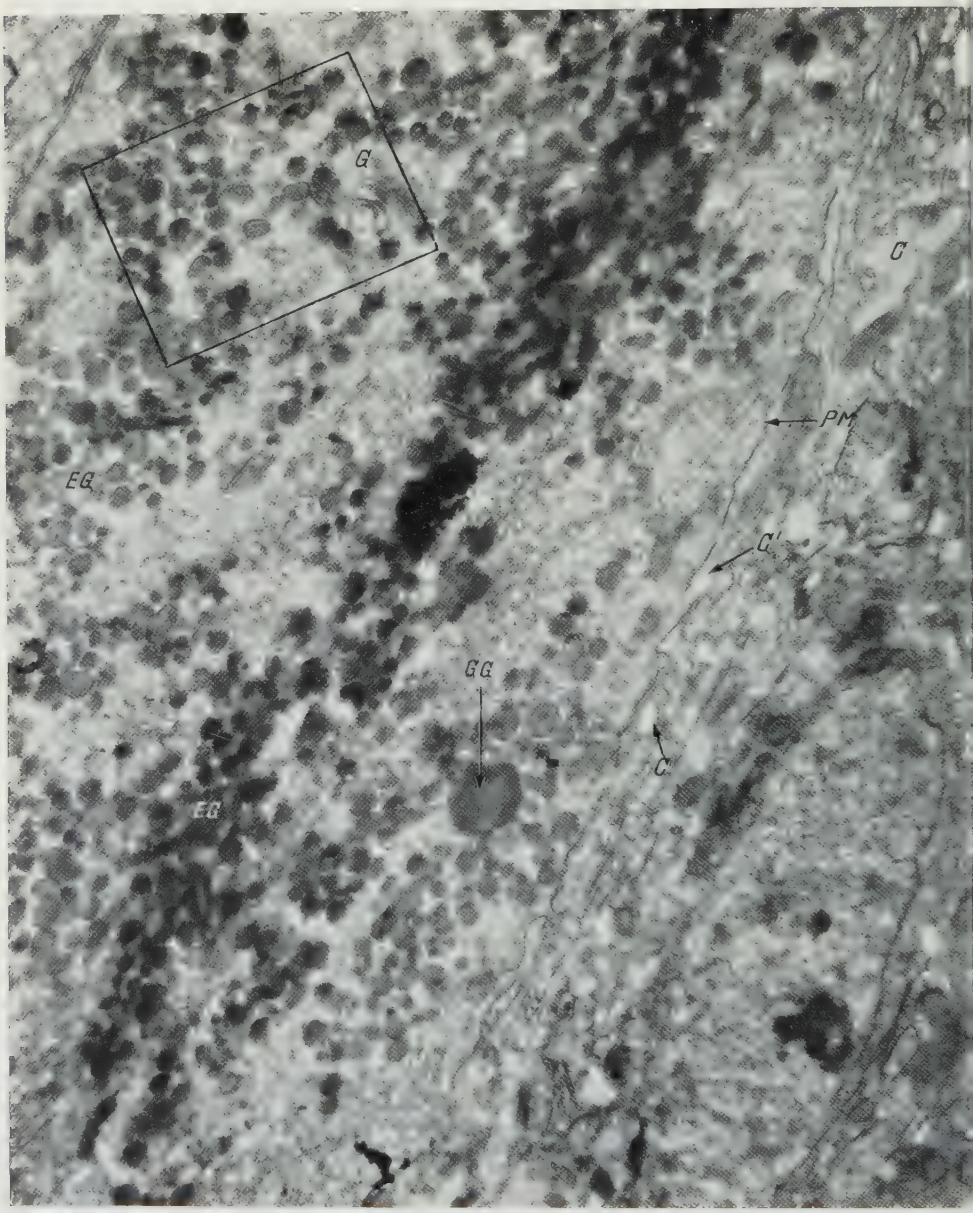


Fig. 4. Periphery of a neurosecretory cell of *Philosamia* packed with elementary granules. *N* Neuroglial cell nucleus; *PM* Plasma membrane of neurosecretory cell; *C* Canaliculi between the neuroglial processes; *EG* Elementary granule; *GG* Giant granule; *G* Golgi lamellae; *C'* Canaliculus probably terminating on the plasma membrane. Magnification: 17150 ×

invertebrates (Knowles 1958; Meyer and Pflugfelder 1958; Hodge and Chapman 1958). It is uncertain whether they are the neurosecretory materials

themselves or structures very intimately associated with them. The granules are called elementary granules according to FUJITA (1957), who coined this term in

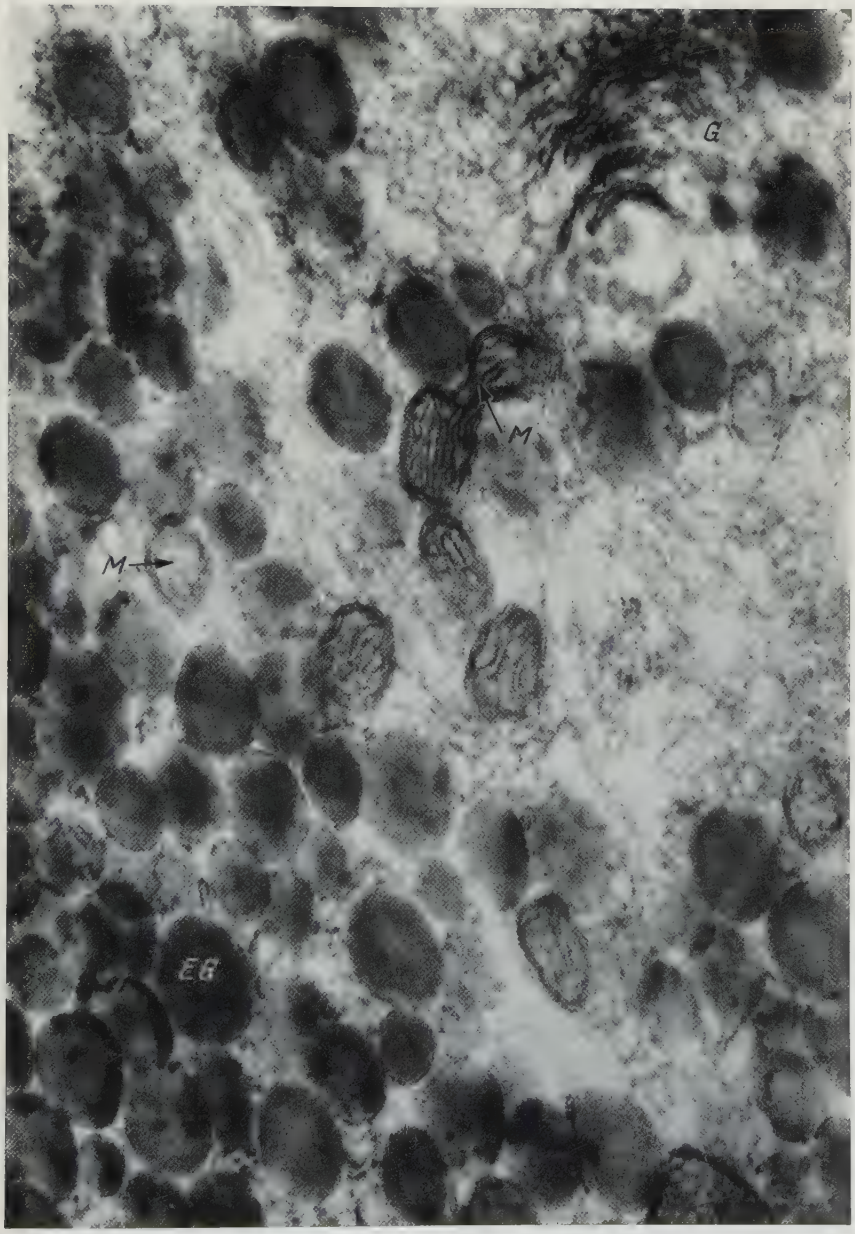


Fig. 5. Elementary granules near the Golgi lamellae of *Philosamia*. *G* Golgi lamellae; *EG* Elementary granule; *M* Mitochondria. (Partial magnification of Fig. 4). Magnification: 55200 ×

his studies of the neurohypophysis of the dog. The granules occur in groups in the peripheral part of the cell or sometimes aggregated into giant granules (7500 Å) as is seen in Fig. 4 (*GG*). It is highly probable that the giant granules correspond

to the secretory granules staining with chrome-hematoxylin as seen under the light microscope.

It seems likely that the Golgi apparatus is related to the formation of the elementary granules, since these are frequently encountered within the Golgi zone. As has been reported by the present author (1960), in *Philosamia* a peculiar feature of mitochondria forming a rosary of ellipsoidal bodies occurs near the Golgi membranes (*M* in Fig. 5). Some distance away from the Golgi membrane, these ellipsoidal bodies appear to be constricted and separated from each other and to migrate among the electron-dense elementary granules described above. Some of these fragmented mitochondria lose their cristae. Gradation with respect to the disappearance of the cristae can be seen and the resulting bodies cannot be distinguished from the elementary granules with membranous walls. These observations seem to favour the view that the elementary granules may originate from mitochondria which receive some material from the Golgi zone as has been suggested for zymogen granules of the mouse pancreas (Challice and Lacy 1954). The membranous wall of the elementary granule would appear to be derived from the mitochondrial wall, although in *Tinca vulgaris*, the outer membrane of the neurosecretory elementary granule evidently originates from the Golgi lamella (Sano and Knoop 1959).

e) Other cytoplasmic inclusions. In the cytoplasm, electron-dense bodies larger and with more irregular outline than the mitochondria are seen. These bodies are presumably of lipide nature, equivalent to the lipochondria or lipide bodies which have been seen in the neurons of the cockroach (Hess 1958). They take random disposition in the perikaryon (*L* in Fig. 1).

Besides, in *Bombyx* there is a stupendous vacuole in the large neurosecretory cell. This vacuole is packed with a structureless substance under the electron microscope.

II. Sheath of the brain in the area of the pars intercerebralis

According to Hess' terminology, the sheath of the brain will be divided into the neural lamella and perilemma: the neural lamella is the structureless outer layer, while the perilemma is the inner cellular layer. But, as seen in Fig. 6, the neural lamella (*NL*) in the area of the pars intercerebralis is not subdivided into four parts as in the cockroach ganglion described by Hess (1958). The perilemma is principally made up of glial cells, the processes of which imbricate extensively and wrap the nerve cells, neurosecretory cells and their axons.

Between the neural lamella and the perilemma, there exists a space (*S*) which seems to contain coagulated hemolymph. Tracheoles (*T*) are often seen in it. This space would then be a blood sinus, and it is evidently connected with the canaliculi (*C*), that take a zigzag course between the processes of the glial cells, to be discussed later.

1. Neuroglia. The neuroglial cells, in the perilemmal layer, have the closest connection with the neurosecretory cells in the pars intercerebralis. These glial cells have an irregularly shaped nucleus (*N* in Fig. 6), which contains in turn dense masses of chromatin. One or two, sometimes three nucleoli, are observed in the nucleus. The glial cytoplasm is rich in rough surfaced endoplasmic reticulum (*E*), mitochondria (*M*) and Golgi apparatus (*G*) as seen in Fig. 7. It forms

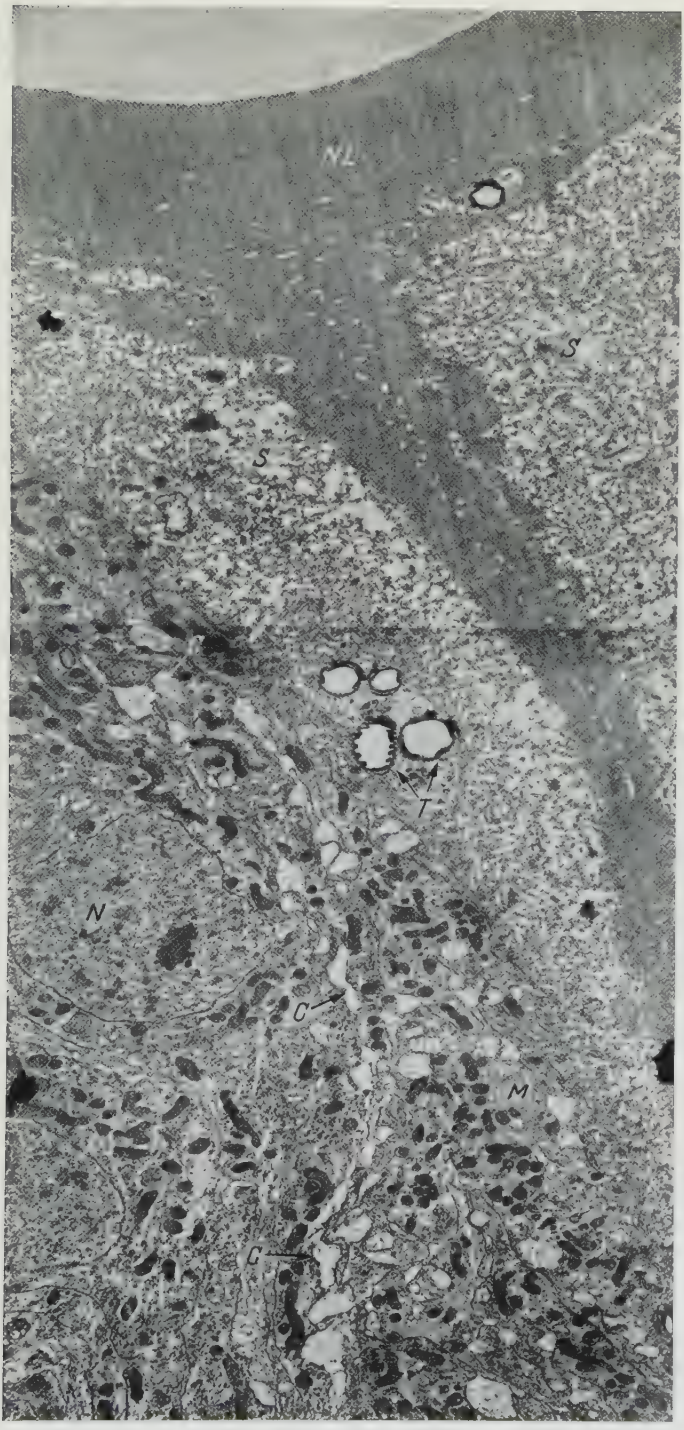


Fig. 6. Sheath of the brain near the pars intercerebralis of *Philosamia*. *NL* Neural lamella; *S* Blood-sinus; *N* Neuroglial nucleus; *M* Mitochondria; *C* Cross section of canaliculi near neuroglial cell processes; *T* Tracheole. Magnification: 10800 ×

a thin layer around the nucleus and extends into many processes. These processes ramify extensively as reported by Hess (1958) in the cockroach ganglia. The ramified processes are extremely complicated. Lipide bodies (*L* in Fig. 7) can often be seen within these processes. Only in *Bombyx*, the glial cell has many

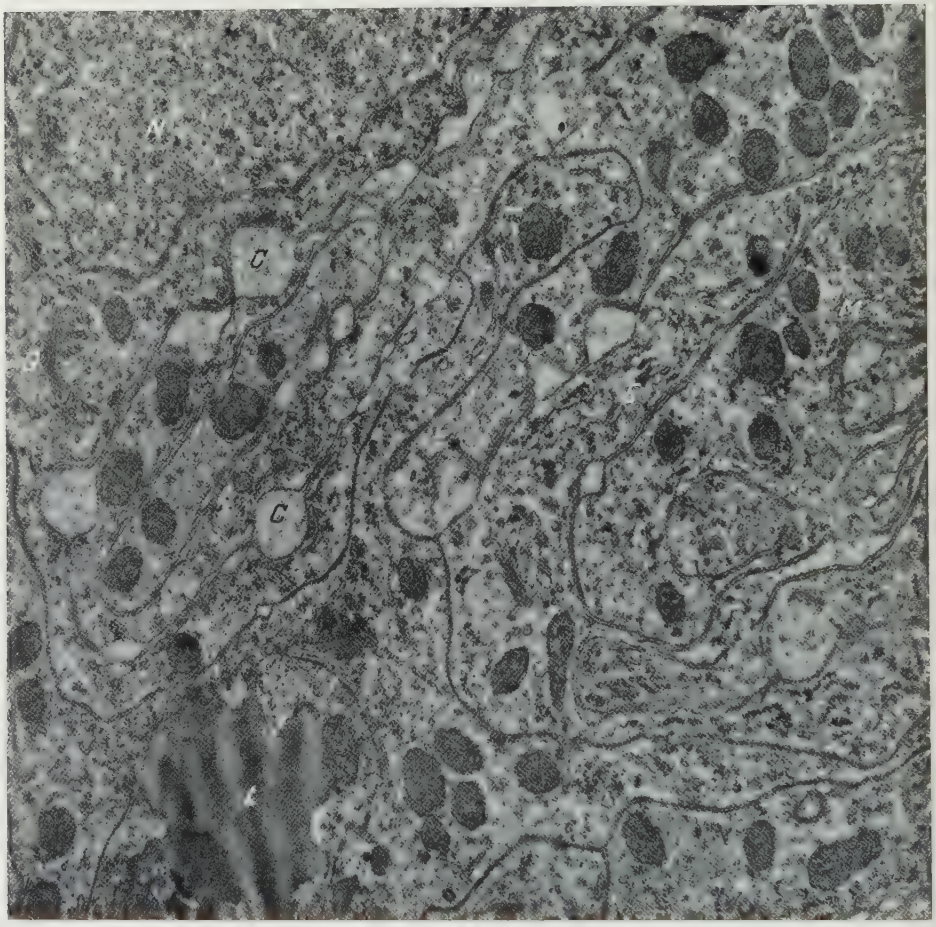


Fig. 7. Neuroglial cell of *Philosamia*. *N* Neuroglial cell nucleus; *G* Golgi lamellae; *M* Mitochondria; *E* Endoplasmic reticulum; *L* Lipide body; *C* Canaliculi between the imbricated neuroglial cell processes. Magnification: 21600 ×

electron-dense bodies (*PB* in Fig. 2) measuring 300—700 mμ in diameter. They take random disposition in the glial processes. From their form and dimension, they seem to coincide with the pigment granules seen in non-stained preparations under the light microscopic observation.

The elongated mitochondria of the neuroglial cell are much more electron-dense than those in the neurosecretory cell and the nerve cell. The prominent features in the perilemmal layer of this part of the brain are many canaliculi of varying sizes (*C* in Figs. 6 and 7). Some parts of canaliculi enlarge into "sinus" containing the coagulation product of hemolymph. The canaliculi seem to be the same as the "glial lacunar system" reported by Wigglesworth (1960) in cockroach ganglia.

2. Relation between the neuroglial cell and the neurosecretory cell. The ramified and overlapping processes of neuroglial cells enmesh the neurosecretory cells, as has been demonstrated by Sano (1958) in hypothalamic neurosecretory cells of the cat as seen under the light microscope. Sometimes, these glial processes

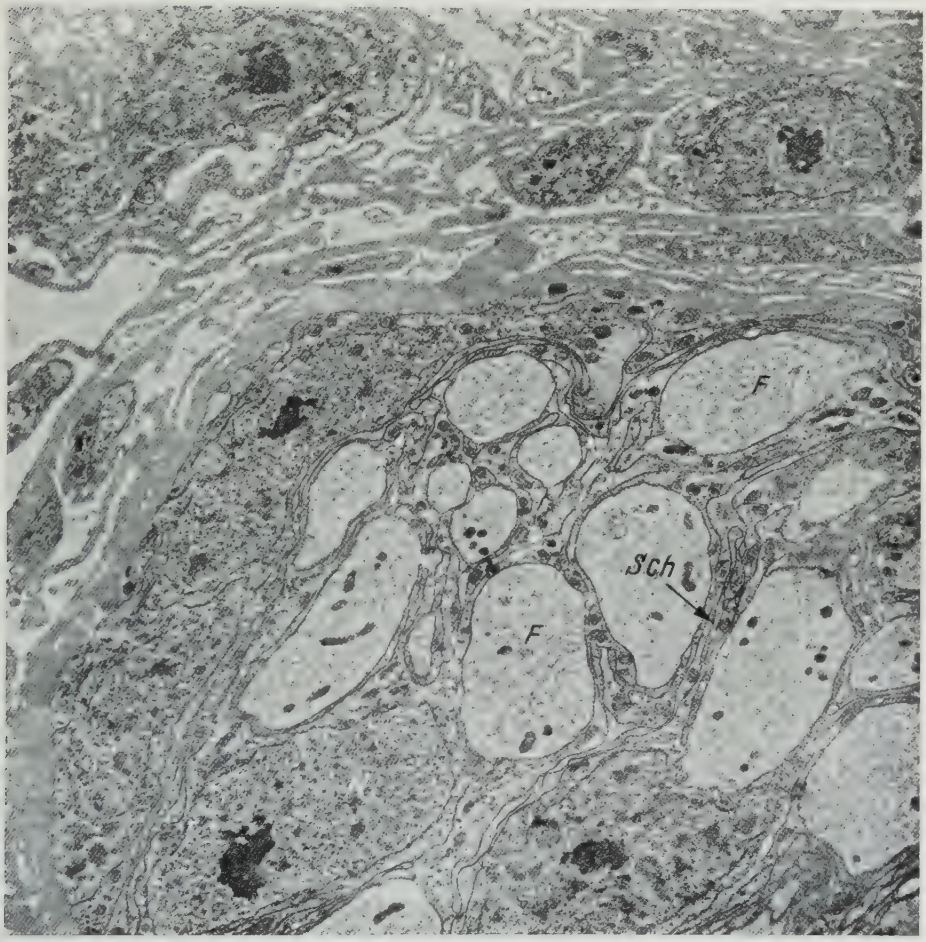


Fig. 8. Cross section of the corpus cardiacum of *Philosamia* showing nerve ensheathed by Schwann cell. *F* Nerve fiber; *N* Schwann cell nucleus; *Sch* Schwann cell processes. Magnification: 8400 ×

invaginate in the neurosecretory cells and in the nerve cells as reported by Hess (1958) in the cockroach-ganglia. This invagination may facilitate the transport of nutritive material from the glial cells to the neurons. Recently, Wigglesworth (1960) made a similar statement regarding cockroach ganglia.

On the other hand, the aforesaid canaliculi passing through the glial cell processes come in contact with, or sometimes may terminate on the plasma membrane of the neurosecretory cells (*C'* in Fig. 4) as well as of the nerve cells. These structures also might serve as the transfer of the nutritive substance from the blood to the ganglion cells, although Wigglesworth (1960) has suggested their role as a pool of nutrients. At the same time, these structures may constitute a pathway of the neurosecretory products into the blood system.

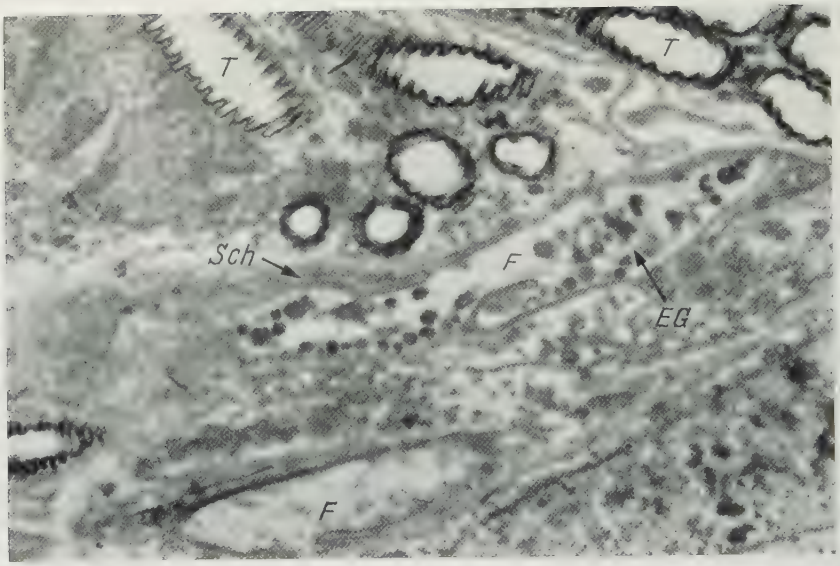


Fig. 9. Elementary granules within nerve fiber in the corpus cardiacum of *Philosamia*. *EG* Elementary granule; *F* Nerve fiber; *T* Tracheole; *Sch* Schwann cell processes. Magnification: 14400 ×

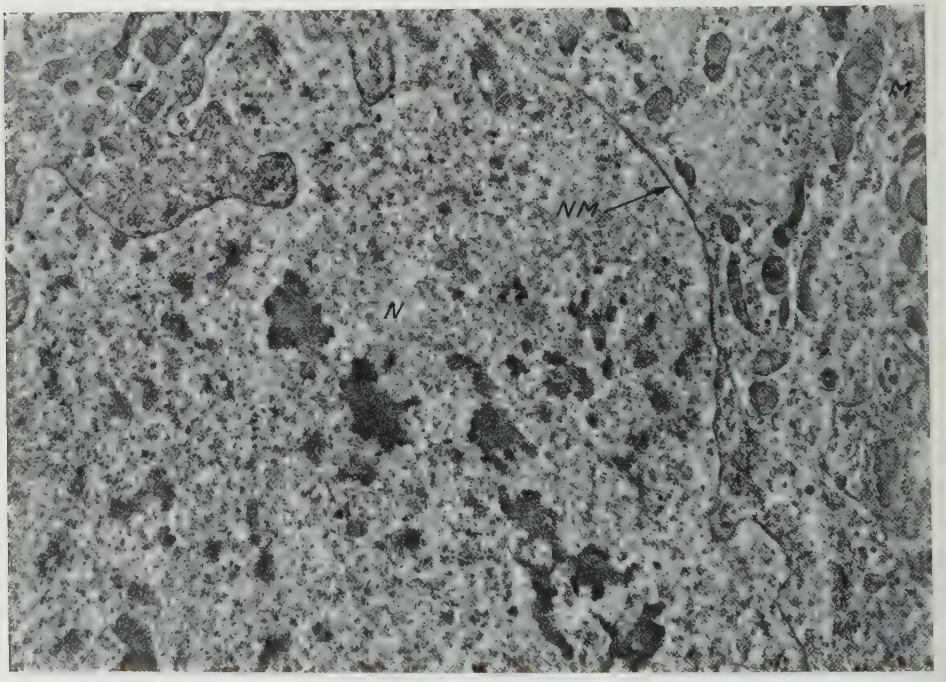


Fig. 10. Cell of the corpus allatum of *Philosamia*. *M* Mitochondria; *NM* Nuclear membrane; *N* Nucleus. Magnification: 13600 ×

III. Neurosecretory pathway

Light microscopic observation reveals that the axons of the medial neurosecretory cell group, after crossing, leave the brain to form the nervus corporis

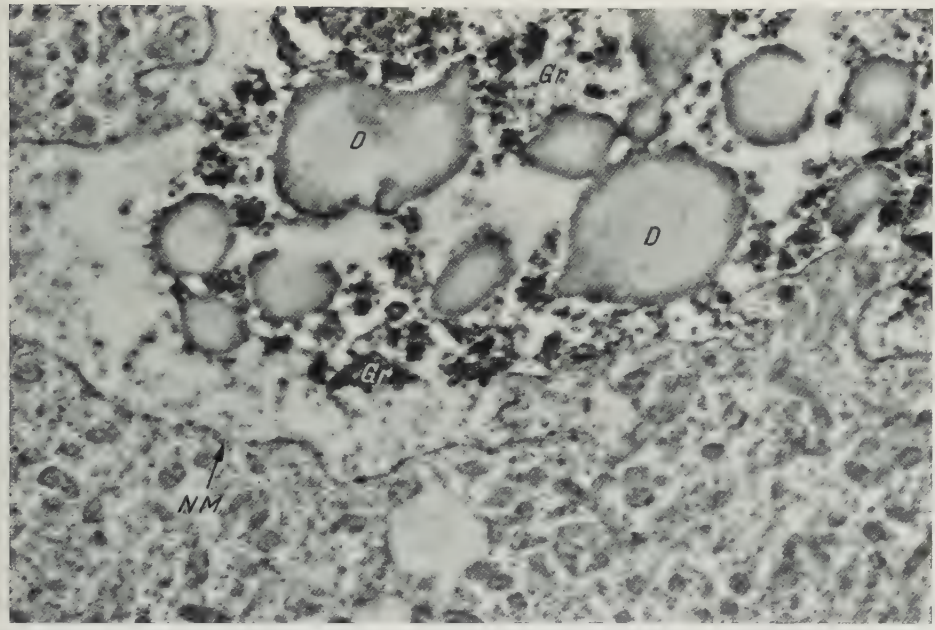


Fig. 11. Nucleus in corpus allatum cell of *Bombyx*. *NM* Nuclear membrane; *Gr* Groups of small granules; *D* Unknown droplet. Magnification: 7100 ×

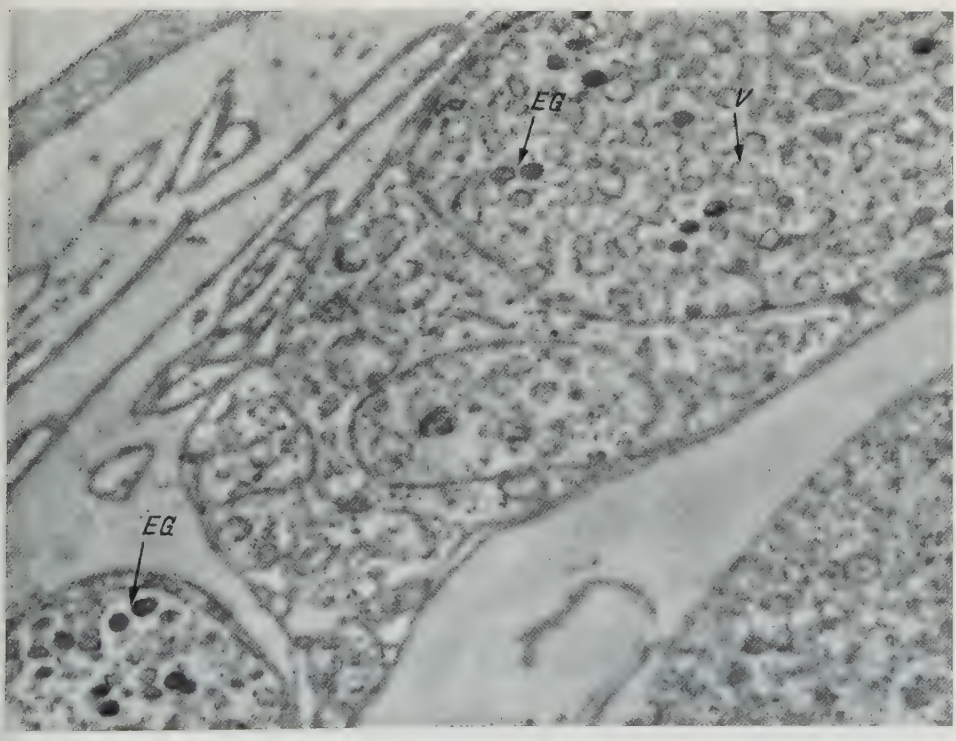


Fig. 12. Nerve terminals containing elementary granules and empty vesicles in *Bombyx*. *EG* Elementary granule; *V* Empty vesicle. Magnification: 17 550 ×

cardiaci I, while the fiber tract originating from the lateral group passes through the brain without crossing and leaves as nervus corporis cardiaci II. The latter joins with the former on the way to the corpus cardiacum. This nerve leaves the organ to innervate the corpus allatum.

1. Corpus cardiacum. On electron micrographs the nerve fibers in this organ are enveloped by the imbricated processes of Schwann cells (Figs. 8 and 9), and the nerve fibers contain numerous mitochondria and sometimes neurosecretory elementary granules (*EG* in Fig. 9). No nerve endings could be identified with confidence in this organ. This may bear a relationship to the experimental result that the organ functions, if at all, only as a minor storage center of neurosecretory material (Ichikawa and Nishiitsutsuji-Uwo 1959).

2. Corpus allatum. The corpus allatum is an oviform organ connected with the posterior part of the corpus cardiacum by the nervus corporis allati. It bifurcates into two main branches immediately after its entry into the corpus allatum; one runs along the peripheral part of this organ and the other terminates in the center of it. As is well known, the organ secretes the juvenile hormone; besides it acts as the storage center of the brain hormone.

a) Cells of the corpus allatum. The cells of the corpus allatum are so complicated in shape that it is difficult to trace their outline. They contain many ribosomes and mitochondria of various sizes and shapes. Both structures are found scattered throughout the cytoplasm. The nuclear membrane is also rather complicated in outline (*NM* in Figs. 10 and 11). In the karyoplasm, small granules occur in groups of different sizes (*Gr* in Fig. 11). Furthermore, in *Bombyx*, peculiar, giant, less electron-dense droplets are seen (*D* in Fig. 11). Nothing can be said about the nature of these droplets, except that it is safe to say that they are not artifacts, because various fixatives were used to ascertain this point. It is also a problem of the future to disclose a correlation between these droplets and the juvenile hormone.

b) Nerve terminal of the neurosecretory cell. The neurosecretory nerve terminal of the intercerebralis-cardiacum-allatum tract seems to form a sac-like dilatation. As seen in Fig. 12, the terminals contain electron-dense granules, ranging between 600—4000 Å in diameter (*EG*). It is highly probable that these granules are identical with the elementary granules specified in the perikaryon of the neurosecretory cells. The terminals contain also many empty vesicles (*V*) measuring 900—4600 Å in diameter, which may correspond to the empty vesicles observed in the nerve terminals in the neurohypophysis of the cat (Green and van Breemen 1955) and of the rat (Hartmann 1958). They may also be equivalent to the granules of type 3 described by Fujita (1957) in the neurohypophysis of the dog. Depending perhaps on the phase of secretory activity the proportion of the granules and the vesicles may vary, i.e., when the granules are more abundant, the vesicles are more scarce, and vice versa.

Discussion

1. Formation of the neurosecretory material. In the present investigation on the commercial silkworm and the Eri-silkworm, the most striking feature of the neurosecretory cells in the pars intercerebralis is the occurrence of fine, spherical or ellipsoidal, electron-dense granules measuring about 600—3600 Å in diameter.

They are referred to as the neurosecretory elementary granules according to Fujita's terminology coined on investigation of the vertebrate hypophysis (1957). The same structures have been detected within the nerve fibers in the neurohypophysis of various vertebrates (Bargmann 1958; Duncan 1956; Green and van Breemen 1955; Hartmann 1958; Palay 1957) and in the neurosecretory cells of the caudal spinal cord of vetrebrates (Enami and Imai 1958; Sano and Knoop 1959), as well as in the nerve fibers in the corpus cardiacum of the stick insect (Meyer and Pflugfelder 1958), in the post-commissure organ of the prawn (Knowles 1958) and in the sinus gland of the land crab (Hodge and Chapman 1958).

Based on light microscopic observation, Kurotsu and Kondo (1941) stated that the neurosecretory granules in the cells of the hypothalamus of *Bufo vulgaris japonicus* are derived from the plastosome (mitochondria). This statement was confirmed by Ito and Oishi (1950) with the same species. As to the insect, Nayar (1955) suggested that the neurosecretory granules of the pars intercerebralis of *Iphita limbata* are also derived from mitochondria. On the other hand, Romieu, Stahl and Cotte (1953) have stated that the Golgi apparatus of the cat may be responsible for the production of neurosecretory material.

From the electron microscopic observation of the caudal neurosecretory system, Enami and Imai (1958) have demonstrated that in *Anguilla japonica* the elementary granules are present in close association with Nissl substance, whereas Sano and Knoop (1959) have insisted that in *Tinca vulgaris* they are produced in the Golgi apparatus or its surroundings.

The present electron microscopic study of the insect neurosecretory cells in the brain revealed the following points: 1. When the elementary granules in neurosecretory cells are rather scanty, there occurs, in general, a well-defined membranous endoplasmic reticulum with Palade granules; the latter granules also occur free in the cytoplasm. By contrast, when the elementary granules are numerous, the rough endoplasmic reticulum becomes scanty. 2. The elementary granules with membranous covering are frequently encountered in the Golgi zone. 3. In the Golgi zone, some of the mitochondria are divided into small fragments and lose gradually their cristae. It is impossible to distinguish such structureless mitochondrial fragments from the elementary granules.

From these observations, it may be surmised that the formation of the elementary granules is in close connection with the mitochondria in the Golgi zone, but that the rough endoplasmic reticulum appears also to be involved. The membranous wall of the elementary granules could be a derivative from the mitochondrial wall.

2. Transportation of the neurosecretory material and its release. In 1944, B. and E. Scharrer discovered that in *Leucophaea* the neurosecretory granules migrate along the axons from the neurosecretory cells in the pars intercerebralis of the brain to the corpus cardiacum. This observation was subsequently confirmed by many workers in various insects. In lepidopterans, Arvey, Bounhiol and Gabe (1953) and Kobayashi (1957) have observed that the neurosecretory granules in the pars intercerebralis of *Bombyx* are transported along the axon to reach not only the corpora cardiaca but also the corpora allata. However, there is also some information indicating the direct release of the neurosecretory

substance from the perikaryon (Rehm 1950, *Ephestia*, and Williams 1952, *Cecropia*). Dual mode of secretion from the neurosecretory cells seems probable in the lepidopterous insects. Our previous experimental data are favorable to the transportation theory (Ichikawa and Nishiitsutsuji-Uwo 1959, 1960; Ichikawa and Takahashi 1959), but a recent experiment showing that brains with nervi corporis cardiaci severed on both sides, can release enough brain hormone to cause the imaginal differentiation of brainless diapausing pupae of *Philosamia*, speaks in favor of direct secretion from the perikaryon (Nishiitsutsuji-Uwo, unpublished data).

The electron micrographs indicate that the neurosecretory cells in the pars intercerebralis are enmeshed by the neuroglial cell processes, among which there exist canaliculi communicating with a blood sinus. The canaliculi are in contact with the plasma membrane of the neurosecretory cell. Although elementary granules can not be seen within the canaliculi, these structures are apparently convenient for direct secretion of the secretory material from cell into blood system.

On the other hand, other electron micrographs indicate that the elementary granules are transferred via axons to the corpora allata, because the sac-like dilations of the nerve endings contain the same elementary granules and empty vesicles as found in the perikaryon of the neurosecretory cells. The vesicle may be the cast of the secretory material, as has been claimed by Fujita (1957) and Hartmann (1958) regarding mammals.

Summary

1. Electron microscopic studies of the neurosecretory system in the lepidopterous insects, *Bombyx mori* and *Philosamia cynthia ricini*, were performed in the mature larvae.

2. The perikaryon of the neurosecretory cell in the pars intercerebralis contains characteristic granules in addition to the common features of the nerve cells. These granules are fine, spherical or ellipsoidal and relatively uniform in electron density. Each one is about 600—3600 Å in diameter (1200 Å on the average) in *Bombyx* and about 1000—3200 Å (1800 Å on the average) in *Philosamia*. These granules are referred to as the elementary granules.

3. When the neurosecretory cell is rather poor in elementary granules, there occur, as a rule, numerous well differentiated, rough surfaced cytomembranes.

4. The elementary granules are produced in close relation to the mitochondria in the Golgi zone. The endoplasmic reticulum with RNA granules seems also concerned with the formation of the neurosecretory material.

5. The neurosecretory cells are enveloped by processes of neuroglial cells, and between the processes there exist many branched canaliculi of varying sizes. Some of these canaliculi make contact with the plasma membrane of the neurosecretory cell.

6. The release of the neurosecretory material from the perikaryon may take place into these canaliculi and from there into the blood sinus. But there is also indication that the elementary granules are transported via axon into the corpora allata and stored in them. The nerve terminals in the corpus allatum form bulbous dilatations in which elementary granules and empty vesicles are abundant. In

the light of our experimental results, it is likely that the neurosecretory material is discharged from the terminals into the body fluid, although the actual discharge of the material could not be demonstrated in electron micrographs.

Literature

Arvy, L., J. J. Bounhiol et M. Gabe: Déroulement de la neurosécrétion protocérébrale chez *Bombyx mori* L. au cours du développement post-embryonnaire. C. R. Acad. Sci. (Paris) **236**, 627—629 (1953).

Bargmann, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Neurohypophyse, S. 4—12. Zweites Internat. Symposium über Neurosekretion, Lund, 1.—6. Juli 1957. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958.

Bahr, G. F., G. Bloom and U. Friberg: Volume changes of tissues in physiological fluids during fixations in osmium tetroxide or formaldehyde and during subsequent treatment. Exp. Cell Res. **12**, 342—356 (1957).

Challice, C. E., and D. Lacy: Fine structure of exocrine cells of the pancreas. Nature (Lond.) **174**, 1150—1151 (1954).

Duncan, D.: An electron microscope study of the neurohypophysis of a bird, *Gallus domesticus*. Anat. Rec. **125**, 457—473 (1956).

Enami, M., and K. Imai: Studies in neurosecretion XII. Electron microscopy of the secrete granules in the caudal neurosecretory system of the eel. Proc. jap. Acad. **34**, 164—168 (1958).

Estable, C., and J. R. Sotelo: The behavior of the nucleolonemata during mitosis. Symp. of fine structure of cells. Union internat. Sci. biol., Ser. B, No 21, Groningen 1955.

Fujita, H.: Electron microscopic observations on the neurosecretory granules in the pituitary posterior lobe of dog. Arch. hist. jap. **12**, 165—172 (1957).

Green, J. D., and V. L. van Breemen: Electron microscopy of the pituitary and observations on neurosecretion. Amer. J. Anat. **97**, 177—227 (1955).

Hartmann, J. Fr.: Electron microscopy of the neurohypophysis in normal and histamine-treated rats. Z. Zellforsch. **48**, 291—308 (1958).

Hess, A.: The fine structure of nerve cells and fibers, neuroglia and sheaths of the ganglion chain in the cockroach (*Periplaneta americana*). J. biophysic. biochem. Cytol. **4**, 731—742 (1958).

Hodge, M. H., and G. B. Chapman: Some observations on the fine structure of the sinus gland of a land crab, *Gecarcinus lateralis*. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 571—574 (1958).

Horstmann, E., u. A. Knoop: Zur Struktur des Nucleolus und des Kernes. Z. Zellforsch. **46**, 100—107 (1957).

Ichikawa, M., and J. Nishiitsutsuji-Uwo: Studies on the role of the corpus allatum in the Eri-silkworm, *Philosamia cynthia ricini*. Biol. Bull. **116**, 88—94 (1959).

— — Studies on the insect metamorphosis. VII. Effect of the brain hormone to the isolated abdomen of the Eri-silkworm, *Philosamia cynthia ricini*. Mem. Coll. Sci. Univ. Kyoto, Ser. B **27**, 9—15 (1960).

—, and S. Takahashi: Study on the endocrine activity of *Bombyx*-allatum in the diapausing *Philosamia*-pupa. Mem. Coll. Sci. Univ. Kyoto, Ser. B **26**, 249—252 (1959).

Ito, T., u. K. Oishi: Zytologische Untersuchung der Zwischenhirndrüse von *Bufo vulgaris japonicus*. Okajimas Folia anat. jap. **23**, 35—50 (1950).

Knowles, F. G. W.: Electron microscopy of a crustacean neurosecretory organ. Zweites Internat. Symposium über Neurosekretion, Lund, 1.—6. Juli 1957, S. 105—109. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958.

Kobayashi, M.: Studies on the neurosecretion in the silkworm, *Bombyx mori* L. Bull. Sericul. exp. Stat. **15**, 181—273 (1957).

Kurotsu, T., u. H. Kondo: Über die Beziehung zwischen dem Jahreszyklus und der feineren Zellstruktur des Nucleus praeopticus magnocellularis bei *Bufo vulgaris japonicus* Schlegel. Jap. J. med. Sci. Anat. **9**, 64—65 (1941).

Meyer, G. F., u. O. Pflugfelder: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Corpora cardiaca von *Carausius morosus* Br. Z. Zellforsch. **48**, 556—564 (1958).

Nayar, K. K.: Studies on the neurosecretory system of *Iphita limbata* Stal. I. Distribution and structure of the neurosecretory cells of the nerve ring. Biol. Bull. **108**, 296—307 (1955).

Nishiitsutsuji-Uwo, J.: Fine structure of neurosecretory system in Lepidoptera. Nature (Lond.) **188**, 953—954 (1960).

Palade, G. E.: A small particulate component of the cytoplasm. J. biophys. biochem. Cytol. **1**, 59—68 (1955).

Palay, S. L.: The fine structure of the neurohypophysis. In: Progress in Neurobiology. vol. II, edit. by H. Waelsch. New York: P. B. Hoeber 1957.

Rehm, M.: Sekretionsperioden neurosekretorischer Zellen im Gehirn von *Ephestia kühniella*. Z. Naturforsch. **5**, 167—169 (1950).

Romieu, M., A. Stahl et G. Cotte: Cytologie des cellules nerveuses de l'hypothalamus. Acta anat. (Basel) **18**, 74—79 (1953).

Sano, Y.: Beobachtungen zur Morphologie der Neurosekretion bei Wirbeltieren, S. 63—67. Zweites Internat. Symposium über Neurosekretion, Lund, 1.—6. Juli 1957. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958.

—, u. A. Knoop: Elektronenmikroskopische Untersuchungen am kaudalen neurosekretorischen System von *Tinca vulgaris*. Z. Zellforsch. **49**, 464—492 (1959).

Scharrer, B.: Neurosecretion. XI. The effect of nerve section on the intercerebralis-cardiacum-allatum system of the insect, *Leucophaea maderae*. Biol. Bull. **102**, 261—272 (1952).

—, and E. Scharrer: Neurosecretion. VI. A comparison between the intercerebralis-cardiacum-allatum system of the insects and the hypothalamo-hypophyseal system of the vertebrates. Biol. Bull. **87**, 242—251 (1944).

Weyer, F.: Über drüsenartige Nervenzellen im Gehirn der Honigbiene, *Apis mellifica* L. Zool. Anz. **112**, 137—141 (1935).

Wigglesworth, V. B.: The nutrition of the central nervous system in the cockroach, *Periplaneta americana* L. The role of perineurium and glial cells in the mobilization of reserves. J. exp. Biol. **37**, 500—512 (1960).

Williams, C. M.: Morphogenesis and the metamorphosis of insects. Harvey Lect. **47**, 126—155 (1952).

Yasuzumi, G., and H. Ishida: Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy. II. Submicroscopic structure of developing spermatid nuclei of grasshopper. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 663—668 (1957).

Dr. J. Nishiitsutsuji-Uwo, Zoological Institute, College of Science University of Kyoto (Japan), Sakyoku, Kitashirakawa

Zeitschrift für Zellforschung 54, 631—653 (1961)

Aus der Medizinischen Universitätsklinik (Ludolf Krehl-Klinik) Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. K. Matthes)

ÜBER DAS VERHALTEN VON LEBENDEN BLUT- UND EXSUDATZELLEN IN HOCHPROZENTIGEN, ISOTONISCHEN EIWEISSLÖSUNGEN

Von

D. Wittekind

Mit 12 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. März 1961)

Das Problem der Eiweißaufnahme in lebende Zellen ist in den letzten Jahren mehrfach bearbeitet worden (Holter 1945—1959, Ledoux u. Mitarb. 1954 bis 1956, Chapman-Andresen 1955—1960, Schechtmann 1956, Brachet 1957, Sandritter, Fischer u. Mitarb. 1959, Holtzer und Holtzer 1960). Zwei Wege auf denen Proteine in die Zellen gelangen können, werden diskutiert, einmal die Diffusion durch Zellmembranen und zum anderen die von der cytologischen Forschung zunehmend beachtete Pinocytose — die Aufnahme von Flüssigkeitstropfen durch Pseudopodienbildung der Zellmembran (W. H. Lewis 1931, 1939). Soweit es sich hierbei um in-vitro Untersuchungen handelte, war der Eiweißgehalt der verwendeten Medien relativ niedrig (0,5—4%).

In Anbetracht der Bedeutung, die der Auseinandersetzung zwischen Zellen und eiweißhaltigen Medien zukommen muß, hat demgegenüber das Verhalten lebender Zellen in *konzentrierten* Proteinlösungen (K.P-Lsg.) bisher nur wenig Beachtung gefunden.

Eigens mit diesem Problem befassen sich unseres Wissens nur die Arbeiten der Barerschen Schule. — Auf die Studien von Fermi (1910) an lebenden Bakterien und Pilzen in 20%igen Trypsinlösungen wird hier nicht eingegangen. — Barer u. Mitarb. (1953, 1955) benutzten hochprozentige Eiweißlösungen genau abgestufter Konzentration, um im Phasenkontrastmikroskop (Phako.) den Eiweißgehalt lebender Zellen zu bestimmen. Man hat ihn gefunden, wenn der Brechungsindex des Mediums, dessen Eiweißgehalt zuvor bestimmt wurde, mit dem des Cytoplasmas übereinstimmt und dieses dann praktisch unsichtbar wird. Ist der Proteingehalt des Mediums größer als der des Cytoplasmas, so erscheint die Zelle im negativen Phasenkontrast (bei Verwendung eines Objektivs für positiven Phasenkontrast). Barer und Joseph (1955) wiesen bereits darauf hin, daß Leukocyten im negativen Phasenkontrast, also in einem Medium mit einem Proteingehalt von mehr als 15%—20%, über viele Stunden unter dem Deckglas bewegungsfähig bleiben.

Angeregt von diesen grundlegenden Studien, die vor allem optische und physikalisch-chemische Eigenschaften lebender Zellen sowie das Verhalten ihrer Trockengewichte zum Gegenstand hatten und der Interferenzmikroskopie manche Anregung geben konnten, befaßten wir uns speziel mit der Frage, *welchen Einfluß die Erhöhung der Proteinkonzentration im Suspensionsmilieu auf bestimmte Lebensäußerungen von Zellen* hat, und ob gegebenenfalls Unterschiede in der Wirkung verschiedener Eiweißarten zu bemerken sind. Dabei mußte das Studium folgender Eigenschaften lebender Zellen in besonderem Maße lohnend erscheinen: 1. die Zellbewegung, 2. die Pinocytose, 3. die Adhäsionsfähigkeit.

Es ist offensichtlich, daß Untersuchungen dieser Art eine Fülle von Faktoren zu berücksichtigen haben. a) Herkunft, Art und Lebensalter der Zellen, b) physikalische und chemische

Faktoren wie Temperatur, Licht, Ionengehalt des Mediums mit seinem Einfluß auf den osmotischen Druck, p_H-Wert, in geringerem Maße auch die Substratbeschaffenheit (Glas, Gel-Arten u.a.). Soweit die Wirkung dieser Faktoren mit den verwendeten Methoden nachweisbar ist, soll in späteren Mitteilungen darüber berichtet werden. In dieser Arbeit stehen der Einfluß der Proteinkonzentration, vor allem des γ-Globulins und die im Vergleich mit hochprozentigen Albuminlösungen beobachteten Unterschiede, im Vordergrund.

Material und Methoden

Von 32 Personen verschiedenen Alters und Geschlechts wurden 10 cm³ Venenblut entnommen. Zusatz von 5 mg Heparin. Leukocytenkonzentration nach Stehenlassen der Blutprobe durch Abheben der Schicht über den Erythrocyten innerhalb einer Stunde nach Blutentnahme. In einzelnen Fällen Zentrifugieren bei 1000 T/min. Zum Vergleich wurden Leukocyten und Histiocyten aus Exsudaten von 21 Patienten mit verschiedenen Leiden (vor allem Carcinomkrankheiten und Tuberkulose) untersucht. Ein Teil der Zellen wurde in den isotonischen Lösungen nach Hanks sowie Chance und Hess (1959) bzw. in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, ein anderer unmittelbar in den Proteinlösungen suspendiert.

Immersionsmedien. Verwendet wurde γ-Globulin Fraktion II und Albumin Fraktion V der Armour Lab. Das pulverförmige Eiweiß wird nach dem Vorgehen von Barer und Joseph (1955) dem Lösungsmittel schrittweise zugesetzt.

Lösungsmittel. a) 0,85% NaCl, b) Hanks Lösung p_H 6,4, c) Phosphatmedium nach Chance und Hess (1959) p_H 7,3. Verdünnungen der Medien mit Aqua dest. entsprechend der von Barer und Joseph empirisch ermittelten Isotonizität einer 10%igen Proteinlösung mit einer 0,1% NaCl-Lösung (genau 0,08% durch Gefrierpunkterniedrigung bestimmt, Dick, zit. nach Barer und Joseph 1955). Eine etwa 30% isotonische Albuminlösung ist also nach Mischung von 6 Vol.E. 0,9% NaCl mit 3 Vol.E. Aqua dest. erreicht. Da sich aber eine leichte Hypotonie des Mediums als zweckmäßig erwiesen hatte, wurde 0,9% NaCl: Aqua dest. = 6:4 gemischt. Gleiche Mengenverhältnisse auch bei Verwendung der zusammengesetzten Medien. Beurteilung der erreichten Isotonie vor allem nach biologischen Gesichtspunkten (Bewegungs- und Pinocytosefähigkeit der Zellen über 24 Std), aber auch durch Bestimmung der Gefrierpunkterniedrigung (Dr. Krecke), Bestimmung des Eiweißprozentgehaltes mit dem Zeiss-refraktometer. Formel: $C = \frac{n_p - n_w}{\alpha}$, wobei: C – Konzentration, n_p = Brechungsindex der Proteinlösung, n_w = Brechungsindex des Wassers 1,334, α – spezifischer Refraktionsanstieg durch 1 g Protein/100 ml Lösung = 0,00185 für Albumin und Globulin.

p_H-*Werte.* 30% Albumin in NaCl p_H 5,2; 30% Globulin in NaCl p_H 6,4. Ferner wurde nach Anpassung des p_H-Wertes durch Dialyse (modifiziertes Verfahren nach Kohn) untersucht: Dialysieren 30% Proteinlösungen in Medium gegen das entsprechende Medium (Hanks Lösung, calciumfreier Phosphat-Puffer, 0,9% NaCl) bei 6°. Anschließend Ersatz der Dialysierflüssigkeit durch Polyvinylpyrrolidon zur Eiweißkonzentration. Werte von etwa 30% wurden wieder erreicht.

Getestete Konzentrationen. 2%, 5%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%. Übertragung der Zellen in die gekühlten (6°) oder bei Zimmertemperatur (etwa 23°) gehaltenen Eiweißlösungen.

Ionengehalt der K.P-Lsg. nach Präparation in Aqua dest. (entsprechende Änderung nach Mischung mit den o.g. Salzlösungen):

	Na	K	Ca
a) 10% Globulin:	24 mval	0,12 mval	negativ
b) 30% Globulin:	40 mval	0,1 mval	0,2 mval
c) 30% Albumin:	24 mval	0,1 mval	2,5 mval

Bestimmung der Brechungsindices mit Abbé-Refraktometer (Zeiss).

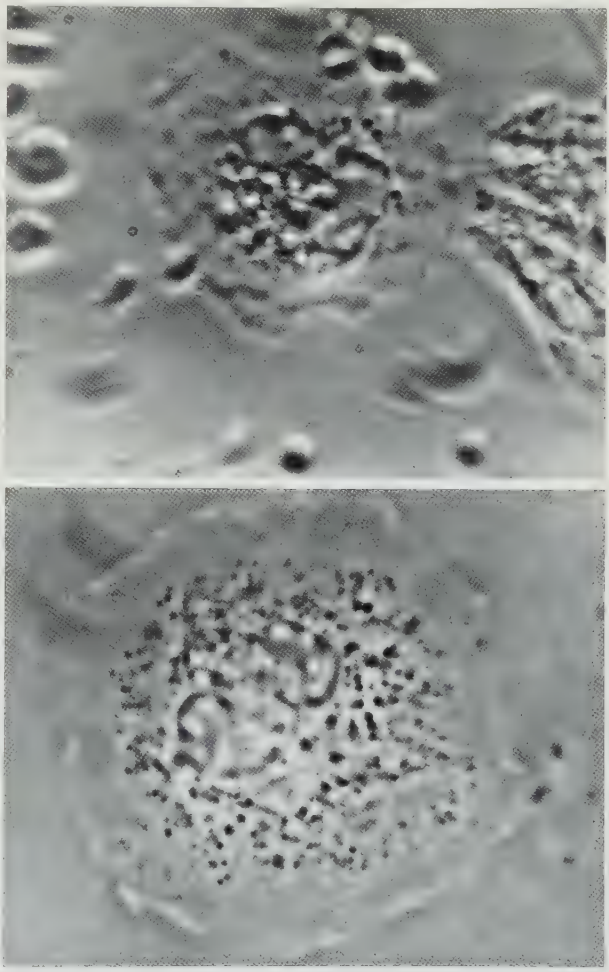
Durchströmungskammerverfahren. Aufgießen von wenigen Kubikzentimetern Blut auf das Deckglas im paraffinierten Deckglaskästchen, nach etwa 20 min Waschen durch mehrmaliges Eintauchen in 0,9% NaCl, Auflegen des Deckglases auf den Objektträger; zwischen diesem und Deckglas zwei Glasfragmente von 0,2 mm Durchmesser, um ein Durchsaugen von Flüssigkeiten zu ermöglichen.

Auftropfen der Test-Eiweißlösung am freien Rand, Auflegen von Saugpapier an der Gegenseite; durch Vermischung der Testlösung mit dem vorigen Medium Ausbildung eines Konzentrationsgradienten vom freien Rand zur Deckglasmitte. Etwa 20% Proteingehalt wird dort angenommen, wo infolge Gleichheit der Brechungsindices von Cytoplasma und Umgebung nur der Zellkern sichtbar ist.

Ergebnisse

Im Durchströmungskammerversuch mit 30% Globulin in Hanks-Medium als Testlösung lassen sich fast alle wesentlichen Reaktionen der Zellen in einem Untersuchungsgang an einem Präparat beobachten. Der Ablauf eines Experimentes wird daher zusammengefaßt geschildert. Die Zeitangaben sind naturgemäß nicht exakt, sondern stellen Mittelwerte aus mehreren Wiederholungen dar.

Kontrolle vor Versuchsbeginn. Zellen im eigenen Plasma: Gute Glasadhärenz der Leukocyten und Monocyten, geprüft durch vorsichtigen Deckglasdruck. Feine Pseudopodien nach verschiedenen Seiten. Manche Zellen in langsamer Bewegung, einzelne mit kernnahen, optisch leeren Vakuolen, einige mit solitären, etwas gröberen Granula. Wenig auffällige Brownsche Bewegung der neutrophilen Granula. Typisches, aus zahlreichen Beschreibungen bekanntes Bild der Blutzellen (Bessis 1952, Rominger, Michel und Hansen 1952, Policard und Bessis 1953, Kosenow 1956, Rind 1959).



a

b

Abb. 1a u. b. Der Glasfläche anhaftender, segmentkerniger Leukocyt. Medium: Blutplasma. b Stabkerniger Leukocyt in 30% isotonischer γ-Globulinlösung. Noch stärker ausgebreitet auf der Unterlage als die Zelle in Abb. 1a

Zeit 0. Die unter das Deckglas eingeführte isotonische 30% γ-Globulinlösung erreicht die Zellen: langsames Abnehmen des Cytoplasmakontrastes gegen das Medium, nur Kernsegmente und Granula sichtbar. Langsames Wiedererscheinen des Cytoplasmas im negativen Phasenkontrast: Die Zone der Mischung aus K.P.-Lsg. und Serum ist über die Zelle hinweggegangen, diese befindet sich jetzt in der Proteinlösung höherer Eiweißkonzentration und damit eines höheren Brechungsindex, verglichen mit dem Cytoplasma.

4 min. Lebhafte Granulabewegung in umschriebenen Cytoplasmabereichen. Hier allmählich Ausbildung von Pseudopodien.

6 min. Langsame Zunahme der glasadhärenten Zellfläche, besonders deutlich in Zellen außerhalb des zentralen Lichtbündels. Beginnende Kernschwellung (Abb. 1a und b).

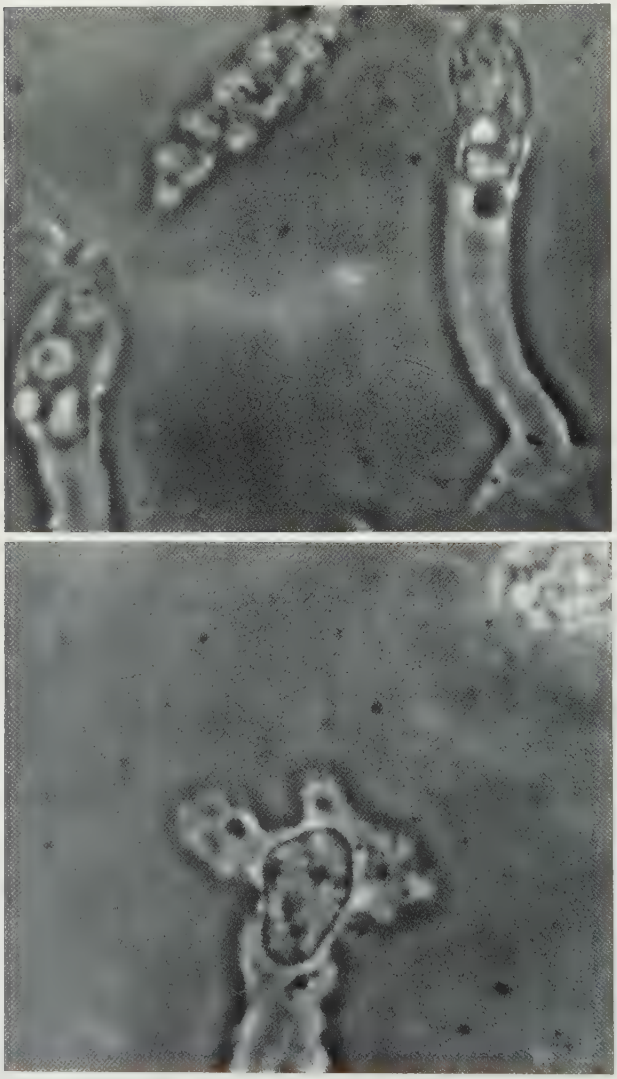


Abb. 2 a u. b. a Typische Leukocytenbewegung in konzentrierter Globulinlösung. Langgestreckte Zellformen, intensiv negativer Phasenkontrast. Granulabewegung (im Bild unsichtbar) im Bereich des Plasmasol, Kernsegmente im Gelanteil. Pinocytosevakuole am vorderen Kernsegment in der rechten Zelle. b Typische Monocytenbewegung: Breite, plumpe Cytoplasmafortsätze, einige Pinocytosevakuolen. Kernschwellung

10 min. Fortschreitende Pseudopodienbildung in Leukocyten (L.). Manche L. noch breit der Glasfläche anhaftend.

13 min. Zunehmende Pseudopodienbildung und axiale Orientierung in vielen L., andere noch breit glasadhärent mit sehr lebhafter Bewegung der Granula. Monocyten (M.): Etwa die Hälfte mit sehr träge bewegten, plumpen Pseudopodien, die übrigen unbeweglich, rund. Fortschreitende Kernschwellung. Auffallender Unterschied zwischen den sehr dynamischen L. und den zäh sich bewegenden M. (Abb. 2a, b).

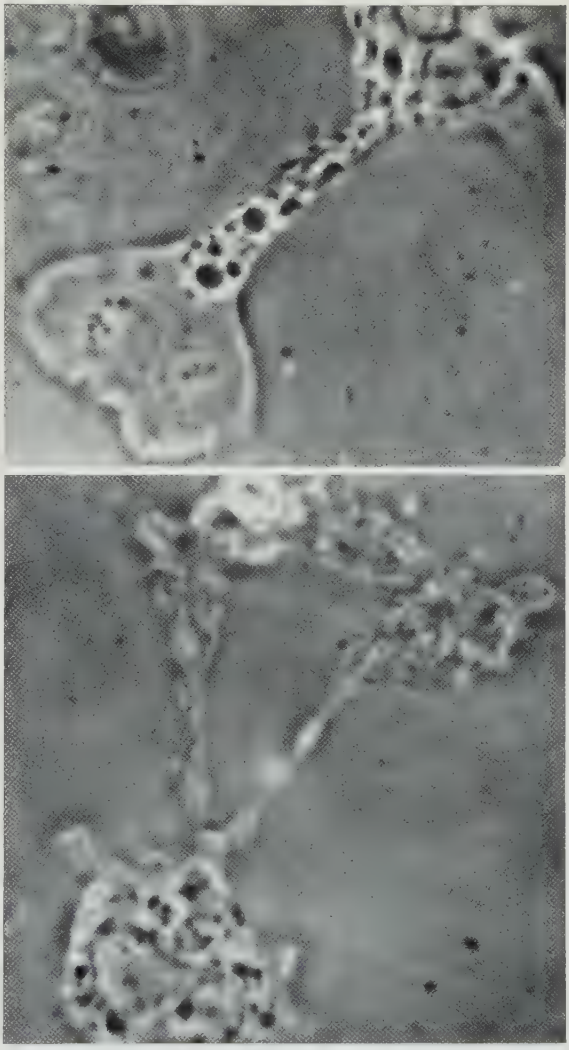
19 min. Mehrzahl der L. langgestreckt, Pseudopodien in einer Richtung. Einzelne M. mit größeren Ausläufern und ersten Anzeichen von Pinocytose (Pz.). *Thrombocyten* (Th.): seit Versuchsbeginn gequollen, feine, fadenartige Verbindung zwischen den einzelnen Th. (Abb. 3b).

23 min. Jetzt auch in den breit glasadhärenten L. die ersten schwach grauen Pz.-Vakuolen (Pz.V.). Einige M. haben ihre neugebildeten Pz.V. schon wieder ausgestoßen.

38 min. Rückgang der Zahl glasadhärenter, Zunahme der langgestreckten L. Beginnende Ausbildung plumperer Pseudopodien in vielen M., andere dagegen bleiben rund und unbeweglich, können aber doch schon Pz.V. enthalten.

Der Bewegungsablauf stimmt in wesentlichen Punkten mit den aus der Literatur bekannten Beschreibungen überein. Ein Unterschied ist allerdings in der größeren Lebhaftigkeit der Bewegung, auch in der erheblich intensiveren quantitativen Ausbildung der Pseudopodien in K.P.-Lsg. gegeben. Das Ausstrecken

der Pseudopodien geschieht manchmal ruckartig im Sinne einer plötzlichen Aussackung eines Sektors der Zellwand, ebenso rasch kann das Nachfließen der Granula in den neugebildeten Ausläufer erfolgen. In den Zellen, die sich unabhängig von der Unterlage bewegen, kann die Pseudopodienaussendung in drei Dimensionen erfolgen. Der Wechsel der Zellform in dieser Versuchsphase ist zu schnell, um sich kinematographisch festhalten zu lassen. Langsamer ist der Bewegungsablauf im rückwärtigen Teil der Zelle, im Bereich des Plasmagel, wo die Granula unbeweglich bis zu dem unscharfen Übergang in die Solpartie liegen, meist mit mindest zwei der Kernsegmente. Diese können bei der langsamen Wanderung nach vorne durch oft tiefe Kontraktionsringe (W. H. Lewis 1939) deformiert werden.



a

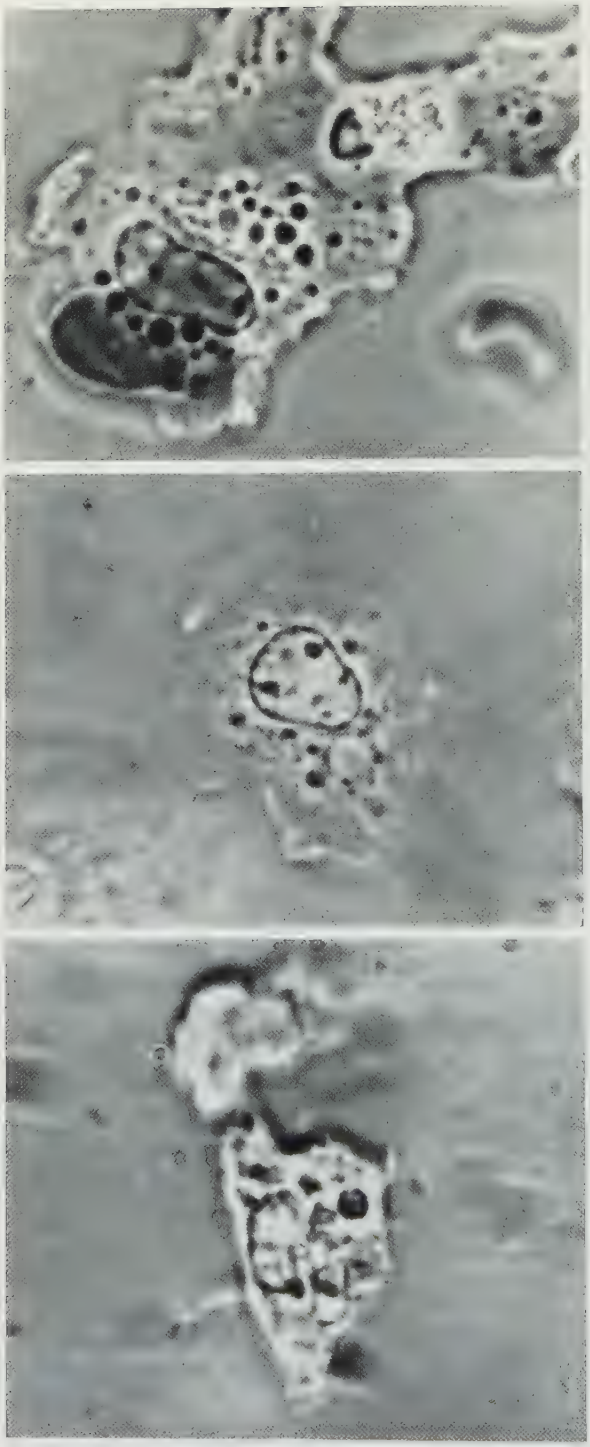
b

Abb. 3a u. b. a Cytoplasmaausläufer. Leukocyt mit gestielter Cytoplasmaausbuchtung, in welche Pinocytosevakuolen und Granula einwandern. γ-Globulin 30 %. b Cytoplasmabrücke zwischen einem Thrombocytenhaufen (oben) und einem Monocyten mit Pinocytosevakuolen (unten)

Durch Deckglasdruck läßt sich die freie Beweglichkeit der meisten dieser langgestreckten L. nachweisen. Wenn sie doch noch anhaften, so vor allem mit dem rückwärtigen (Gel-) Anteil.

Charakteristisch für L. in konzentrierter γ-Gobulinlösung ist die Aussendung breiter Cytoplasmaausläufer, die mit dem Zellkörper über lange Cytoplasmabrücken in Verbindung stehen (Abb. 3a), über die Pz. V. und Granula langsam vor und zurück wandern können. Diese Ausläufer werden wieder völlig retrahiert, wenn der Höhepunkt der Aktivität überschritten ist. Die Granula können lebhaft beweglich bleiben, bis sie unmittelbar vor dem Verschwinden der Pseudopodien allseitig von der Zellmembran unmittelbar umklammert werden.

Pz. V. sind in den beweglichen L. nur ganz vereinzelt, häufiger dagegen in M. anzutreffen. Alle Vakuolen haben bis jetzt ein etwa gleiches Aussehen: sie sind



meist rund, mattgrau (Abb. 3, 4), folgen langsam der Plasmaströmung, liegen aber häufig in Kernnähe. — In einzelnen L. und M., die mehrere optisch leere, sehr helle Vakuolen enthielten, sind diese zu einem solitären, größeren Hohlraum zusammengeflossen (Abb. 4b).

45 min. Fast alle L. jetzt in langgestreckter Bewegung und praktisch ohne Pz.V. Wechselnde Aufnahme und Abgabe von Pz.V.

75 min. Noch vermehrte Ausbreitung der langgestreckten L., die vereinzelt Pz.V. der oben beschriebenen Art (Typ I) enthalten, aber auch dichtere, gelbliche, sehr scharf von der Umgebung abgegrenzte (Typ II, Abb. 4c). Letztere jetzt auch in den stärker ausgebreiteten M., deren Kerne durch hochgradige Schwellung deutlich hervortreten (Abb. 5). Kriechende L., die sich gegenseitig berühren, können sofort die Richtung wechseln, oft kommt es aber zunächst zu einer großflächigen gegenseitigen Berührung.

90 min. Höhepunkt der L.-Ausbreitung jetzt etwa erreicht. Manche L. jetzt wieder breit glasadhärent mit vielen Pz.V. I und II, die sich kaum in den wandernden L. finden.

Abb. 4a—c. a Zahlreiche runde, mattgraue bis schwarze Pinocytosevakuolen (TypI). γ-Globulin 30 %. Kernschwellung. Stabkerniger Leukocyt? b Chronische myeloische Leukämie, unreife Leukocytenvorstufe. Pinocytosevakuole Typ I. Unterhalb des Kerns optisch leere Vakuole. Vergleiche den Dichteunterschied gegenüber Pinocytosevakuole. c Segmentkerniger Leukocyt. Etwas unregelmäßig begrenzte, scharf konturierte, dichte Pinocytosevakuole (Typ II)

Intensive Pinocytoseaktivität auch in M. *Thrombocyten:* Kaum noch einzeln liegend, zu großen Plaques agglomeriert, diese oft unter sich und mit Zellen durch lange, fadenförmige Brücken verbunden (Abb. 3b)[1].

115 min. Fortgesetzte intensive Zellaktivität (L. und M.). Pz. V. Typ I überwiegen. Weitere Ausbildung der Cytoplasmabrücken.

4 Std 50 min. Höhepunkt jetzt deutlich überschritten. L.: Mehrzahl jetzt wieder mit einer mehr runden Form, enthalten aber viel Pz. V., überwiegend Typ II. Daneben noch immer langgestreckte L. mit weniger Pz. Noch lebhafte Brownsche Bewegung. — M.: Rückgang der Kernschwellung. Annäherung an runde Zellformen angedeutet, aber noch viele mit ausgebreiteten Pseudopodien. Viele Pz. V. I und II. Zunehmende Aneinanderlagerung von Zellen. Einige besonders blasenartig aufgequollen.

5 Std 10 min. L.: Langsame Zunahme abgerundeter Formen mit vielen Pz. V. I und II, daneben immer noch einige langgestreckte fast ohne Pz. M.: Noch relativ starke Ausbreitung, unterschiedliche Pz.

7 Std 15 min. L. *und* M.: Keine Schwellung der Zellkerne mehr, M. daher weniger deutlich hervorgehoben. Zunehmende Abrundung und Zusammenlagerung der phasennegativen Zellen; zahlreiche Pz. V. II (Abb. 4c) und I. Daneben noch immer einzelne L. langgestreckt, beweglich, mit minimaler oder fehlender Pz.

9 Std 15 min. Fast alle Zellen abgerundet, geschrumpft, so daß kaum noch eine Unterscheidung zwischen L. und M. möglich ist. Pz. V. noch vorhanden. Brownsche Bewegung der Granula erhalten. Zahlreiche, ausgedehnte Zellplaques.

24 Std. Keine Pseudopodienbildung mehr. Stellenweise noch lebhafte Granulabewegung in den abgerundeten Zellen, die keine Glasadhärenz mehr zeigen.

48 Std. Keine deutliche Veränderung mehr, außer der Bildung runder, blasenartiger Cytoplasmaausstülpungen (Potocytose) in stark negativem Phako (Abb. 6).

Überblick über das Gesamtpräparat auf dem Höhepunkt der Zellaktivität. Die oben geschilderten Vorgänge sind nahe dem Deckglasrand, an dem die K.P.-Lsg. eingesaugt wurde, zu beobachten. Bei Verschiebung des Präparates zum gegen überliegenden Rand nimmt die Eiweißkonzentration ab, die des Kontrollmediums zu. Entsprechende Abnahme

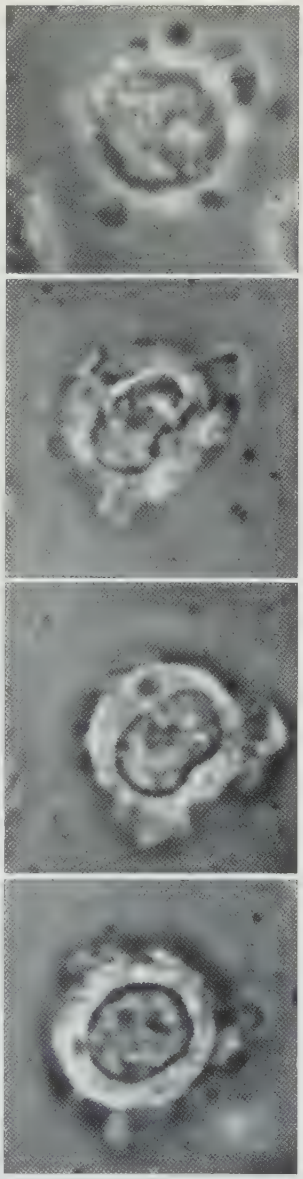


Abb. 5a—d. Wirkungen des Mediumwechsels auf einen Monocyten: a Die Zelle in Blutplasma. Die Konturen des hufeisenförmigen Kernes sind zu erkennen. b Zustand wenige Minuten nach Mediumwechsel. Zelle in negativem Phako. Beginnende Kernschwellung. c 22 min nach Mediumwechsel. Bereits fortgeschrittene Kernschwellung. Pinocytosevakuole oberhalb des Kernes. d 45 min nach Mediumwechsel. Die Pinocytosevakuole von Abb. c in die Peripherie verdrängt. Neu gebildete optisch leere Vakuole an gleicher Stelle. Neue Pinocytosevakuole links vom Kern

von Zellmotilität, Aggregationsneigung und Pz., insbesondere am Umschlagspunkt vom negativen zum positiven Phasenkontrast.

[1] Die Bilder ähneln durchaus den bei „visköser" Metamorphose beobachteten. Auf die umfangreiche Thrombocytenliteratur wird hier nicht eingegangen.

Zusammenfassung der nach Mediumaustausch (isotonische Kontrollösung gegen isotonische konzentrierte γ-Globulinlösung) beobachteten Vorgänge. Proportional der Eiweißkonzentration (Maximum 30% γ-Globulin) kommt es nach Wechsel des Mediums zu einer deutlichen Steigerung der Zellmotilität, ferner zur tropfenweisen Aufnahme der Immersionsflüssigkeit in die Zellen — zur Pillocytose — die bisher an L. im eigenen Blutplasma kaum, an M. in geringem Umfang bekannt war. — Schließlich war eine stark vermehrte Agglomerationsneigung der Zellen zu bemerken.

Diese Erscheinungen sind besonders auffallende Merkmale von Lebensäußerungen, welche an den Zellen gesetzmäßig über einen Zeitraum von etwa 10 bis 12 Std bei Zimmertemperatur unter Deckglasbedingungen ablaufen. Die Kontaktfläche zwischen Zellen und Glas nimmt nach dem Mediumwechsel vorübergehend zu. Sodann lösen sich zunächst die dynamischeren L. ab, offensichtlich weil der „Zwang zur Bewegung" vorläufig intensiver ist als die Neigung, nochmals an einer Oberfläche zu adhärieren. Später gehen die meisten L. wieder in eine Phase der Glasadhäsion über.

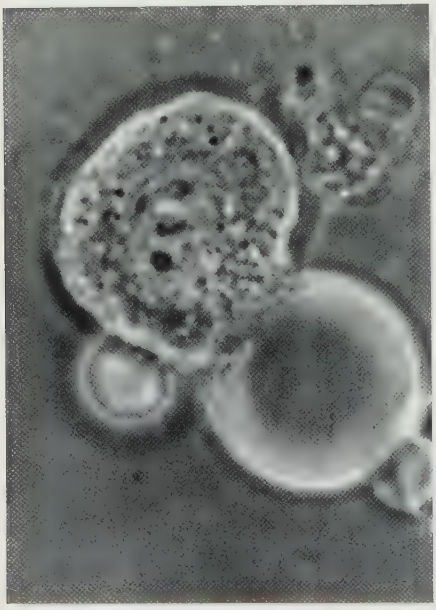


Abb. 6. Eine große und eine kleine Potocytoseblase. Mesothelzelle, 30 % Globulin, p_H 6,98. Stark geschwollene Mitochondrien im Cytoplasma

Das Maximum der Zellaktivität liegt zwischen der 1. und 4. Std und ist von einer starken Kernanschwellung, in den M. stärker als in den L., gekennzeichnet. Die Zellen bewegen sich unabhängig von einer soliden Unterlage. Lebhafte Motilität und Pz. scheinen sich gegenseitig weitgehend auszuschließen, was in den aktiveren L. mehr hervortritt, als in den langsam kriechenden M., welche nur breite, plumpe Pseudopodien aussenden, im Gegensatz zu den zierlicheren Gebilden der L. Pinocytose findet vor allem in ruhenden bzw. glasadhärenten Zellen statt. Die Pz.V. können kurz nach Aufnahme in das Cytoplasma wieder in toto ausgeschieden werden. Ist dies nicht der Fall, so kommt es häufig zur Eindickung der als Typ I bezeichneten, mattgrauen Vakuolen und Entstehung der verdichteten, gelblichen Gebilde vom Typ II.

Etwa ab der 6. Std beginnt der Rückgang der Zellaktivität. Schon zuvor war eine Neigung zur Zusammenlagerung in großen Plaques und die Ausbildung weiter Cytoplasmabrücken unter Beteiligung der Thombocyten deutlich geworden. Das Endstadium, welches bis zu 72 Std erhalten bleiben kann, ist gekennzeichnet durch Einziehung der Pseudopodien, Verlust der Haftfähigkeit an Unterlagen, Agglomeration zu großen Gruppen, Abrundung der Zellen durch Schwellung des Cytoplasmas mit entsprechender Zunahme des negativen Phasenkontrasts und gleichzeitiger Kernschrumpfung. Das Phänomen der Potocytose (Zollinger 1948) wird jedoch in konzentrierten Proteinlösungen seltener beobachtet als in Kontrollmedien.

Dieser Schilderung liegt das Verhalten der Mehrzahl beider Zelltypen (L. und M.) zugrunde. — Stets findet man innerhalb der ersten Stunden eine größere Zahl von Individuen, die gegenüber dem Durchschnitt erhebliche Abweichungen der Aktivität zeigen.

Andere Zellarten. Hierauf wird nur kurz eingegangen. *a) Lymphocyten.* Sie bleiben abgerundet, zeigen keine deutliche Pseudopodienbildung, im phako-negativen Cytoplasma sieht man oft einzelne oder mehrere dunkle Körnchen.

b) Eosinophile. Sie sind an den stark lichtbrechenden Granula gut zu erkennen, bleiben meist abgerundet, ohne Bewegung und Pz. (Abb. 7a).

c) Erythrocyten. Bei Isotonie von γ-Globulin- und Albuminlösungen erscheinen sie in ersteren gequollen, oft zu kleinen Gruppen bis zur Aufhebung der Unterscheidbarkeit von Zellgrenzen zusammengeballt (Abb. 9). In Albuminlösungen sind sie dagegen klein, scharf begrenzt, liegen aber einzeln. Vor allem in den konzentrierten Lösungen beider Proteine kann oft Erythrocytophagocytose der L. und M. und vor allem der Exsudatzellen (s. unten) beobachtet werden (Abb. 8).

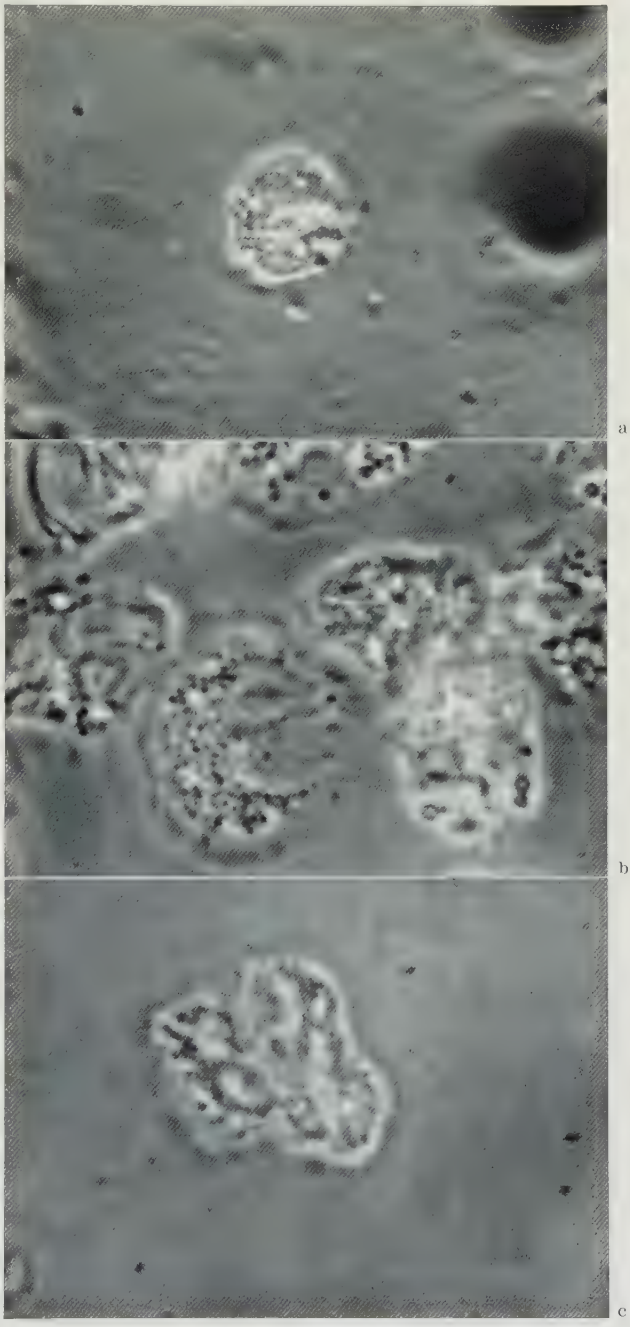


Abb. 7a—c. a Eosinophile im peripheren Blut, Zelle abgerundet, unbeweglich. 30 % γ-Globulin. b Eosinophiler Pleuraerguß. Exsudat als Medium. Zellen glasadhärent; langsame amöboide Bewegung. c Eosinophiler in 30 % γ-Globulin. Lebhafte Bewegung, keine Pinocytose

Ergußzellen. Nur auffallende Unterschiede gegenüber Elementen des peripheren Blutes werden erwähnt. Im Vordergrund steht die in manchen Fällen intensive Pz. großer *Histiocyten* (Abb. 9), während die kleinen Formen in der Regel geringere Aktivität zeigen. Aber auch die großen Histiocyten können von Fall zu Fall erheblich in ihrer Pz.-Leistung variieren. Vakuolen in großer Zahl von gleicher Dichte wie das Medium fanden sich im Cytoplasma insbesondere von Histiocyten, die im Erguß mehrere Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden waren. Diese Vakuolen unterschieden sich phasenoptisch deutlich von jenen, die oft in Histiocyten und anderen Ergußzellen, vielleicht aus anoxämischer Ursache (Wittekind 1960) entstehen. Solche Gebilde, die auch in L. zu beobachten sind, erscheinen in K.P.-Lsg. ebenfalls im negativen Phako (Abb. 4b), im Gegensatz zu den Pz.-Vakuolen. Weitere Untersuchungen über Ergußhistiocyten sind im Gang.

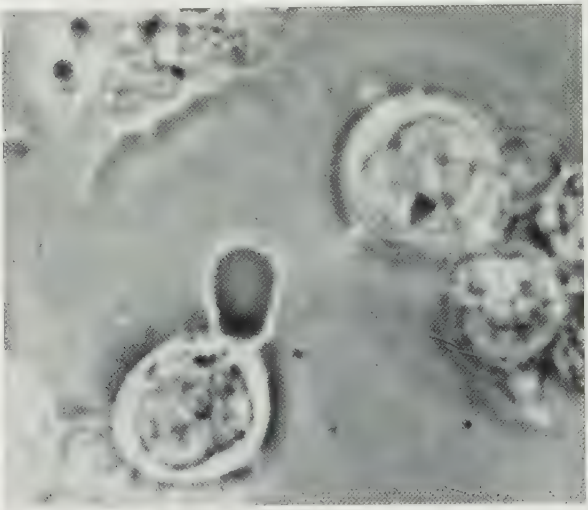


Abb. 8. Erythrocytophagocytose. Zwei Zellausläufer umgreifen zangenartig einen Erythrocyten

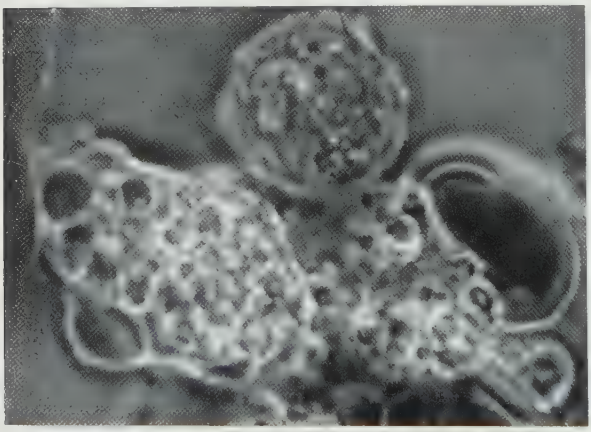


Abb. 9. Großer Histiocyt mit starker Pinocytose. Oben abgerundeter kleiner Histiocyt, stark agglutinierte Erythrocytengruppe

Exsudat-Eosinophile. Ihr Verhalten in einigen eosinophilen Exsudaten war deutlich von dem im peripheren Blut verschieden: sie zeigten in der Kontrolle und in 30% Globulin eine gleichmäßige, fließende Bewegung nach Pseudopodienbildung (Abbildung 7b, c), gute Glasadhärenz, jedoch keine sichere Pz. Ein Richtungswechsel nach dem Zusammentreffen mit anderen Zellen erfolgte erst nach breitflächiger, gegenseitiger Kontaktnahme. Viele zeigten Plasmaströmungen ohne Membranbeteiligung-Cyklosis (de Robertis, Nowinski, Saez 1960).

Lymphocyten. I.a. wie im peripheren Blut, in einzelnen Ergüssen war jedoch eine langsame, amöboide Fortbewegung nachzuweisen. — Blutzellen von chronischen myeloischen Leukämien zeigen in ihrer reiferen Form ebenfalls lebhafte

Bewegung und Pz. *Mesothelien* und *Tumorzellen* lassen unter den Bedingungen dieser Experimente nur ganz vereinzelt vergleichbare Reaktionen erkennen.

Immersion von Blutzellen in γ-Globulin-Lösungen abgestufter Konzentration. Das Verhalten der Zellen in vorbereiteten Proteinlösungen ansteigender Konzentration bestätigt in wesentlichen Punkten die Ergebnisse nach Anwendung der Durchströmungskammer. Die Resultate dieser Versuche werden im folgenden nur insoweit mitgeteilt, als sie ergänzende Informationen erbrachten.

Einige Abweichungen betreffen den zeitlichen Ablauf der Zellreaktionen. Die Unterschiede sind zum Teil auf die veränderten Versuchsbedingungen zurückzuführen: von der jeweils etwas verschiedenen Schichtdicke der Eiweißlösung kann der Zeitpunkt abhängen, zu dem die Zellen mit dem Glas in Berührung kommen und hier adhärieren. Ihrerseits scheint aber die Glasadhärenz einen fördernden Einfluß auf die Pz. auszuüben.

Ferner wurden von Fall zu Fall oft erhebliche quantitative, ihrer Ursache nach zum Teil noch unklare Verschiedenheiten hinsichtlich der Intensitäten von Bewegung und Pz. festgestellt. Da auch Einzelzellen des gleichen Falles erhebliche Abweichungen zu zeigen pflegen, stößt eine zahlenmäßige Erfassung der beobachteten Phänomene (Motilität und Pz.) zunächst noch auf Schwierigkeiten. Durch Konservierung der Präparate bei 8—10° C wurde der Ablauf der hier beschriebenen Erscheinungen erheblich verzögert.

Das Verhalten der Zellen in 2%, 5% Globulin und im Blutplasma (Kontrolle) war ähnlich, allerdings wurde auch in 5% Globulin in wenigen Fällen Pz. beobachtet, deutlicher, bei manchmal bereits negativem Phako, in 10% Globulin. In 30% Lösungen schien diese etwas ausgeprägter als in 35% oder 40%. In solchen hochviskösen Lösungen waren die Pseudopodien vielfach breiter, kürzer und plumper als in 5%—20%.

Deutlich war gegenüber den Kontrollen der konservierende Einfluß ansteigender Globulinkonzentrationen auf die Zellen unter Deckglasbedingungen nach 24 Std und 48 Std nachweisbar (Aufbewahrung bei 10° und bei Zimmertemperatur). a) Nach so langer Aufbewahrung kommt es bei niedriger Globulinkonzentration und in der Kontrolle zum Phänomen der Potocytose — blasenartigen Ausstülpungen der Zellwand mit eiweißarmem Inhalt (Zollinger 1948, Crawford und Barer 1951, Wittekind 1960 u. a.). Diese Potocytose wird in 15%—30% Lösungen nur selten beobachtet. Interessant ist, daß der Eiweißgehalt dieser Membranausstülpungen wechselt: Bereits in 5% γ-Globulin können sie im negativen Phasenkontrast erscheinen, andere sind noch in 10% Globulin im positiven Phako.

b) In den eiweißfreien Kontrollösungen sind nach dieser Zeit die Zellkerne meist strukturlos gequollen, in K.P.-Lsg. dagegen gut erhalten.

c) In der eiweißhaltigen Kontrollflüssigkeit erscheinen zahlreiche intraplasmatische Vakuolen, in den K.P.-Lsg. kaum. Der negative Phasenkontrast bleibt meist während dieser Zeit und bis zu 6 Tagen erhalten; er ist mit erheblichen Graden der Zellquellung vereinbar. Nach Umschlag in positiven Phako, der mit Sicherheit den Zelltod anzeigt, können intraplasmatische Vakuolen noch im negativen Phako bleiben, interessanterweise auch die Zellkerne, ein Phänomen, welches auf dem selektiven Eindringen von Wasser in die Kernsubstanz mit

anschließender Quellung und entsprechendem Rückgang des Brechungsindex des Kernes unter den des Mediums verbunden ist (Abb. 10) (Barer 1957). L. im positiven Phako, mithin tote Zellen, können von lebenden phagocytiert werden (Abb. 11).

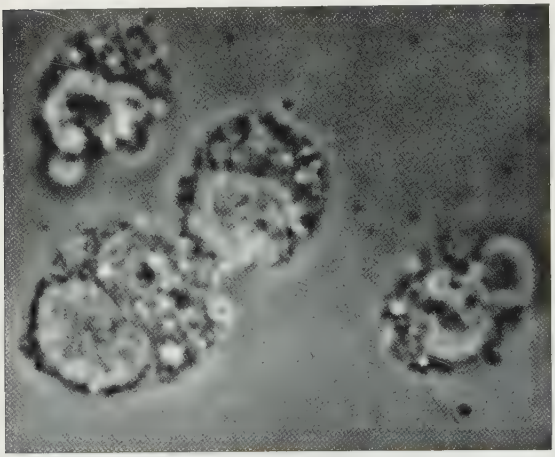


Abb. 10. Myeloische Leukämie, abgestorbene Zellen, positiver Phako. Intraplasmatische Vakuolen und auch Zellkerne (oben) noch im negativen Phako. 30 % γ-Globulin

Einfluß des p_H*-Wertes der Medien auf die Zellen.* Da dieses Problem Gegenstand einer späteren Mitteilung ist, sollen hier nur die für einen Überblick notwendigen Angaben erfolgen. Eine 28% Globulinlösung mit p_H 6,4—6,5, angesetzt in einem Gemisch von Hanks-Lösung und Aqua dest. 6:4, zeigt eine Gefrierpunkterniedrigung von 0,73° C = 380 mosm. Nach p_H-Korrektur auf 7,01 mit n/10 NaOH kommt es zu einem Anstieg auf 456—460 mosm.

Das letztere Medium ist deutlich hypertonisch und hat folgende Wirkung: Die Zellen sind kontrahiert, in schwach negativem manchmal schwach positivem Phako, langsame Bewegung, geringe Ausbreitung, gute Glasadhärenz, meist gegenüber den nicht p_H-korrigierten Vergleichspräparaten stark verminderte oder völlig fehlende Pz.

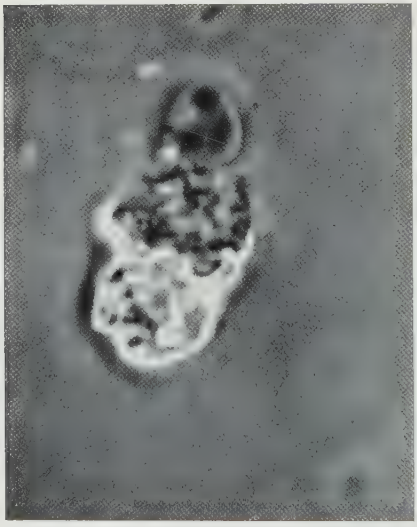


Abb. 11. Lebender Exsudathistiocyt (im negativen Phako), im Begriff eine abgestorbene Zelle (im positiven Phako) zu phagocytieren

Besser wird die p_H-Anpassung durch Dialyse gegen Hanks-Lösung mit anschließendem Wasserentzug durch Polyvinylpyrolidon vertragen. Die Zellbewegung ist im wesentlichen gleich, die Pz. oft etwas stärker, insgesamt ist aber der Unterschied zwischen p_H 6,4 und 7,0 nicht tiefgreifend.

Keine quantitativen Unterschiede bestehen hinsichtlich Zellmotilität, Pz. und Glasadhärenz zwischen K.P.-Lösungen, die mit Hanks-Lösung und solchen, die mit calciumfreiem Phosphatpuffer nach Chance und Hess (1959) angesetzt waren. Pz. geringen Ausmaßes bei starker Zellquellung findet sogar nach Lösung des γ-Globulins in Aqua dest. statt.

Dieses unerwartete Ergebnis wurde auf die in den Proteinpulvern geringen Beimengungen von Calcium und auf die Fähigkeit der Zelloberfläche zur Calciumanreicherung zurückgeführt.

Um den Effekt des Ca-Mangels zu sichern, wurden 3mal in 0,9% NaCl, bzw. in calciumfreiem Phosphatpuffer gewaschene Zellen in 30% Globulin immergiert, welches gegen den Phosphatpuffer dialysiert und anschließend durch Polyvinylpyrolidon konzentriert worden war. Die Zellen ändern ihr Verhalten erheblich: Die Glasadhärenz ist aufgehoben oder in manchen Präparaten deutlich vermindert. Das Phänomen der breit ausladenden Pseudopodien fehlt völlig. Die meisten Zellen liegen einzeln, abgerundet in schwach negativem oder fehlendem Phasenkontrast, manche mit kleinen oder solitären, spitzen Pseudopodien. Die Granulabewegung im Cytoplasma ist aufgehoben oder unterbleibt völlig. Nur in einzelnen Zellen sind kleine Einschlüsse, die vielleicht durch Pz. entstanden, infolge der eng zusammenliegenden Cytoplasmastrukturen jedoch schwer zu beurteilen sind. Die Bildung von Zellplaques ist ebenfalls kaum nachweisbar. — Gelegentlich beobachtete Abweichungen, nämlich Adhäsion der Zellen untereinander und an der Unterlage, werden auf vielleicht immer noch vorhandene Calciumreste zurückgeführt.

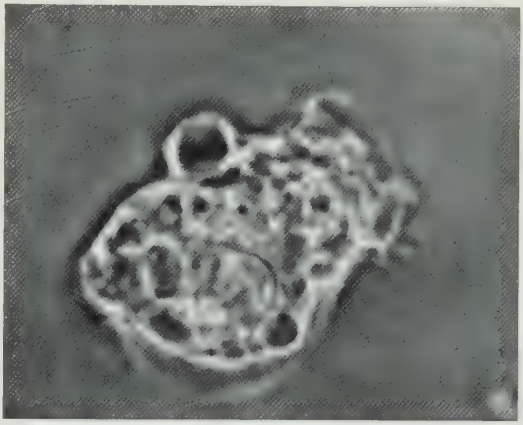


Abb. 12. Exsudathistiocyt in 30% Albumin p_H 6,9. Ausgeprägte Pinocytose und Pseudopodienbildung

Gewaschene und nichtgewaschene Zellsuspension: Der Effekt einer vorsichtigen Waschung der Zellen in eiweißfreien Medien zwischen der Immersion im Plasma und der konzentrierten Proteinlösung ist nicht eindeutig verschieden, eher als fördernd auf Zellmotilität und Pz. zu beurteilen.

Konzentrierte Albuminlösungen zeigen im Prinzip ähnliche, in wichtigen Einzelheiten aber auch abweichende Wirkungen auf die besprochenen Zelltypen. Nur die deutlich hervortretenden Differenzen werden hier erwähnt.

Der i.a. in Albumin schneller (nach etwa 5 Std) als in Globulin eintretende Umschlag in positiven Phasenkontrast und wahrscheinlich auch die fehlende Verdichtung von Pz.V. zu Typ II können zum Teil mit dem sauren p_H-Wert unkorrigierter Lösungen — p_H 5,25—5,30 — erklärt werden. Pseudopodienbildung, Pz. und Glasadhärenz ist aber in den Albuminlösungen auch nach Korrektur der p_H-Werte auf 6,4—7,0 schwächer ausgeprägt. Eine bemerkenswerte Ausnahme bilden in manchen Fällen die Ergußhistiocyten, die in korrigierter Albuminlösung (Dialyse gegen Phosphatmedium nach Chance und Hess p_H 6,7—323 mosm, bzw. Albumin 30% in Aqua dest. mit n/10 NaOH auf p_H 6,9 korrigiert) lebhaft Pseudopodien bilden und intensiv pinocytieren (Abb. 12), während die Leukocyten fast unbeteiligt bleiben. Die Histiocyten zeigen auch Erythrophagocytose. An den Pz.V. werden Verdichtungsvorgänge, vergleichbar denen in Globulin, aber in geringerer Quantität, beobachtet.

Die Pseudopodien der L. sind nicht so breit wie in Globulin, sondern meist nur schmal, aus insgesamt abgerundeten Zellen hervorgehend. In 3% und 5%

Lösungen sind die Bildung von Ausläufern und die Zellbewegung stärker ausgeprägt als in den konzentrierteren. Die Neigung der Zellen zur Bildung großer Plaques ist ebenfalls ausgeprägt. Glasadhärenz wird auch hier in calciumarmen Lösungen beobachtet.

Auffallend ist die manchmal erhebliche Polymorphie der *Lymphocyten*, verglichen mit den stets abgerundeten Formen nach Immersion in Globulin. Die Zellgrenzen können wie ausgefranst erscheinen. — Gute Pseudopodienbildung ist in hypotonischen K.P.-Lösungen (30% Albumin in Aqua dest. — 140 mosm) zu beobachten.

Diskussion

Bei der Beurteilung des Verhaltens von L. und M. in konzentrierten Proteinlösungen sind zunächst die besonderen Bedingungen dieser Experimente zu berücksichtigen:

Es werden nicht Zellkulturen untersucht, sondern überlebende Zellen, die unmittelbar nach Entnahme in ihr neues Milieu noch alle Struktureigenschaften mitbringen, die ihnen in vivo anhafteten. Rinaldini (1958) weist auf den Wert solchen Materials in der Erforschung von Eigenschaften normaler und maligner Zellen hin.

Dabei verdient die *Stoffwechselsituation* besondere Beachtung: Die Bedingungen eines Deckglaspräparates liegen vor und es erhebt sich die Frage, auf welche Energiequellen die Zellen zurückgreifen können, denn sowohl Bewegung als auch Phagocytose (Becker, Munder u. Fischer 1958), Pinocytose (Brandt 1958) und die Vergrößerung der Zelloberfläche (P. Weiss 1958) sind energiefordernde Leistungen. Als Sauerstoffquelle für die Zellatmung kommen praktisch nur gleichzeitig vorhandene Erythrocyten (in den Kontrollpräparaten) in Betracht. Fehlen sie, so wird man in den anderen Medien den frei vorhandenen O_2 vernachlässigen können. — Aber auch bei Anwesenheit größerer Erythrocytenmengen in K.P.-Lsg. dürften die Zellen ihren Energiebedarf aus der Glykolyse decken. Diese Annahme ist deshalb gerechtfertigt, weil die weißen Blutzellen ohnedies unter unphysiologischen Bedingungen, z.B. nach Übertragung in Salzlösungen und nach Abkühlung (23°) die Atmung einstellen (Warburg 1959). Dann wird man aber für L. unter solch veränderten Lebensbedingungen in Übereinstimmung mit Remmele (1955) einen über mehrere Stunden etwa konstanten Stoffwechsel annehmen dürfen.

Die Glykolyse müßte in erster Linie von der endogenen Glykogenreserve ihren Ausgang nehmen. Dafür, daß die Zellen von ihrer Residualenergie leben, spricht die Beobachtung, daß in den ersten Stunden glukosehaltige und glukosefreie Medien keine sicher verschiedenen Wirkungen auf die erwähnten Zelleistungen erkennen lassen. Im übrigen sind alle K.P.-Lsg. frei von den bekannten, für die Zellkultur notwendigen Wachstumsstoffen. Es handelt sich also lediglich um „protektive Medien" (Carell 1928, K.F. Bauer 1954), die in ihrer konservierenden Qualität unterhalb der neuerdings bekannt gewordenen synthetischen Medien einzuordnen sind, jedoch über das eigene Blutplasma, in welchem sich der Einfluß katabolischer Fermente bemerkbar machen dürfte. Noch bessere Ergebnisse sind von einer Anpassung der K.P.-Lsg. an die Erfordernisse von Zellkulturmedien zu erwarten. Stoffwechseluntersuchungen an Blutzellen in K.P.Lsg. erscheinen dringend erforderlich.

Möglicherweise wird die intensive Zellaktivität in den ersten Stunden auch durch die Vergrößerung der Zelloberfläche begünstigt, welche sowohl die Diffusion im Cytoplasma, als auch den Austausch von Flüssigkeit durch die Zellmembran erleichtert. Die letztere dürfte für Proteine, welche nicht durch Pz. in das Zellinnere gelangen, impermeabel bleiben. Diese Undurchlässigkeit, kenntlich am negativen Phako, kann bis über das Erlöschen anderer Zellfunktionen hinaus erhalten bleiben, was von Barer und Joseph (1955) erkannt und später bestätigt wurde (Wittekind 1958a).

Von speziellem Interesse sind vor allem die unveränderte, *intensive Pseudopodienbildung* an L. und M., sowie die gesteigerte *Pinocytose*. Ebenfalls vermehrt

gegenüber den Kontrollen erscheint die Neigung zur *Adhärenz* der Zellen untereinander und an soliden Oberflächen. Allen drei Erscheinungen dürfte gemeinsam sein, daß sie mit veränderten Reaktionen der Zellmembran in Zusammenhang stehen. Es darf als hinreichend gesichert gelten, daß dieser Eigenschaftswechsel der Zellmembran in erster Linie auf das Protein und nicht auf andere Faktoren im Medium zurückzuführen ist, die zugleich mit der Konzentrationsänderung des Proteins eine mehr oder weniger deutliche Wandlung erfahren haben, wie etwa die Senkung des p_H, welche an sich als bewegungsfördernder Faktor bekannt ist (Dittrich 1959 u.a.). Hierauf scheint vor allem der Versuch mit der Durchströmungskammer hinzuweisen, ferner die Verschiedenheit der Resultate bei Immersion in Albumin und γ-Globulin nach Nivellierung der anderen Mediumbestandteile durch Dialyse.

Die einzelnen in konzentriertem Protein — speziell Globulinlösungen — abgeänderten Lebensäußerungen der L. seien hier kurz erörtert:

1. Zellbewegung. Die meist vertretenen Meinungen über die unmittelbar die Zellbewegungen auslösenden Momente, erst neuerdings von L. Weiss (1960) einander gegenübergestellt, differieren hinsichtlich der Frage, ob hierfür die Gel-Sol-Umwandlungen im Protoplasma (Mast 1926, 1931, Lewis 1931, de Bruyn 1947, Goldacre 1952) oder Kontraktionen allein der Zellmembran (Holtfreter 1949) mit Adenosintriphosphorsäure (ATP) als wesentlichem Faktor (Lettré, Lettré u. Mitarb. 1951a, b) maßgeblich sind. Die so auffallende Lebhaftigkeit der Leukocytenbewegung in K.P. läßt die Richtigkeit der Auffassung Holtfreters viel deutlicher erkennen als die schwächere Zellmotilität im Kontrollpräparat: Die Retraktion selbst ausgedehnter, rein solhaltiger Ausläufer auf das Zellzentrum, umgekehrt aber auch die Heranziehung der gelhaltigen Zellanteile an Pseudopodien flüssigen Inhalts, wäre ohne eine selbständige kontraktile Zellmembran nicht denkbar. Für eine starke Aktivierung der Zelltätigkeit insgesamt spricht die im Zeitraum maximaler Bewegung beobachtete intensive Kernschwellung.

Die in K.P. so deutlich ausgeprägte Polarität frisch untersuchter Zellen ist insofern eine Besonderheit, als sie sich ohne Berührung einer soliden Unterlage entwickelt, also in scheinbarem Widerspruch zu der von Harrison (1914), L. Weiss (1959, 1960) betonten Abhängigkeit der Zellbewegung von einer Oberfläche (Glas, Gele) steht. Eine typische „contact guidance" (P. Weiss 1929, 1958) fehlt demnach. Es wird angenommen, daß die Gesamtheit der Proteinmoleküloberflächen in dem viscösen Medium von der Zellmembran *allseitig* so abgegriffen wird, wie es im Fall einer soliden Unterlage *einseitig* geschieht. Wenn sich diese Hypothese bewahrheitet, so wäre hier vielleicht ein Sonderfall einer „totalen contact guidance" gegeben und die Auffassung, die Zellbewegung sei von einer Unterlage abhängig, müßte nicht völlig aufgegeben werden.

Weiterhin ist anzunehmen, daß verschiedene Proteine der Zelloberfläche in verschiedenem Maße „angenehm" sind, γ-Globulin z.B. mehr als Albumin, wobei aber mit Hinblick auf die lebhafte Pz. von Exsudathistiocyten in Albumin spezifische Differenzen nicht ausgeschlossen sind. Unterschiede in der Viskosität beider Lösungen dürften lediglich eine untergeordnete Rolle spielen. Grundsätzlich ist aber ein bestimmter Viskositätsgrad für die Leukocytenmigration förderlich (Tullis 1953).

Wenn auch das Verhalten der L. in K. P.-Lsg. die Selbständigkeit der Zellmembran als kontraktiles Element sichert, so soll damit die Bedeutung der kontinuierlichen Sol-Gel-Umwandlungen im Zellinneren nicht vernachlässigt werden: Ohne sie ist die eben erwähnte, eindeutig axiale Orientierung lebensfrischer L. unabhängig von einer soliden Unterlage nicht denkbar. Die Abbildung der Zellen im negativen Phako läßt die damit verbundene ungleiche Wasserverteilung — nach Pantin (1926) auf „saurer Schwellung" beruhend — besonders deutlich hervortreten. Wasserreich erscheinen insbesondere jene Zellpartien, die unmittelbar an der Pz. oder Phagocytose beteiligt sind. Für die Beobachtung Holtfreters (1949), wonach in embryonalen Zellen amöboide Bewegungen ohne jede Sol-Gel-Transformation des Cytoplasmas vorkommen, hat sich an L. bisher kein Analogon gefunden.

Solche amöboiden Zellbewegungen wird man von jenen unterscheiden müssen, die nach Blockade der Mitochondrien und damit der Zellatmung etwa durch Victoriablau zustande kommen (Lettré, Lettré u. Mitarb. 1951). Hier handelt es sich um Cytoplasmabewegungen und -abschnürungen, die von der abgerundeten, vor allem der in Teilung befindlichen Zelle ausgehen und auf einem relativen Mangel an ATP beruhen. Eigene Untersuchungen mit ATP und Janusgrün an Blutzellen in K. P. Lsg. unter den Bedingungen des Deckglaspräparates lassen diese Plasmaerscheinungen nicht erkennen.

2. *Pinocytose.* Neben der starken Steigerung der Zellbewegung ist die manchmal sehr ausgeprägte Zunahme der Pz. das am meisten auffallende Ergebnis einer Immersion von L. und Makrophagen in hochprozentigen Eiweißlösungen (Wittekind 1960a, b).

Prinzipiell ist ja neben anderen „Pinocytosis inducers" (z. B. Salzen, (Mast und Doyle 1934, Chapman-Andresen 1958) der fördernde Einfluß des Proteins auf die Pz. von Amöben bekannt (Mast und Doyle 1934, Chapman-Andresen und Prescott 1956, Rose 1957, Holter 1959). Am Beispiel der Amöbe hatten Holter und Marshall (1954) auch bereits auf den intensiv pinocytosefördernden Einfluß des γ-Globulins hingewiesen, Pileri, Ledoux u. Mitarb. (1959) auf den ähnlichen Effekt der Ribonuclease. Chapman-Andresen (1957) sah ebenfalls Pz. bei L. in 1%—4% Lösungen von γ-Globulin ausgeprägter als in solchen von Albumin.

Ihre Beobachtungen werden nun durch die hier geschilderten in einigen wichtigen Punkten ergänzt: a) Pz. in großem Ausmaß findet erst in *sehr* konzentrierten Proteinlösungen statt ($>15\%$). b) Pz. findet bevorzugt im Zustand des „étalement" (Bessis u. Bricka 1949) statt, also in ausgebreiteten, der Unterlage anhaftenden Zellen mit weit verzweigten Grenzen (Abb. 2b, 3b, 4a, b). Der Wechsel vom Kontrollmedium zur K. P. Lsg. wirkt fördernd auf Pz., Zellbewegung und Oberflächenvergrößerung ein, jedoch ist der letztere Typ der Lebensäußerung stärker herausgefordert als die Pz. in dem Sinne, daß zunächst die Zellen bereits aufgenommene Pz.-Vakuolen ausstoßen, sich von ihrer Unterlage ablösen und in langgestreckte Bewegung übergehen. Danach kann erneut ein Stadium der Adhärenz folgen. Im Prinzip kann die Gegensätzlichkeit von amöboider Bewegung und Pz. (Chapman-Andresen 1960) bestätigt werden, wenn sie auch nicht als ausschließlich anzusehen ist. — Bemerkenswert sind die wiederholt beobachtete Konfluenz von Pz. V. sowie ihre sehr schnell erfolgende Ausstoßung, die nicht nur vom Zellzentrum, sondern auch von der Peripherie erfolgen kann.

Damit ist *eine* Form der Auseinandersetzung zwischen dem lebenden Cytoplasma und den durch Pz. aufgenommenen Eiweißtropfen angedeutet. Eine andere Reaktionsmöglichkeit ist der Zelle durch ihre Fähigkeit gegeben, die

Tropfen durch *Wasserentzug* einzudicken. Als Symptom dieses Vorgangs ist der Übergang des Vakuolentyps I in II, die Konzentration gelblicher Gebilde anzusehen.

Von dieser Fähigkeit macht sie auch anderen vakuolären Einschlüssen gegenüber Gebrauch, etwa den hyalinen Tropfen in Tubuluszellen der Niere (Randerath 1947, Hein 1937), den Nahrungsvakuolen der Amöben (Andresen 1956) oder den Krinomgranula (Altmann 1955, Zeiger und Schmidt 1957, Wittekind 1958). Von den beiden Möglichkeiten der Reaktion, Extrusion oder Konzentration des Vakuoleninhalts, hängt auch das Schicksal der Vakuolenmembran ab: entweder sie wird im Stadium I mit ausgestoßen oder bei der Konsolidierung (Typ II) aufgelöst, was fluorescenzmikroskopisch schon für einen anderen Vakuolentyp nachgewiesen werden konnte (Wittekind 1958b). Holter und Marshall (1954) hatten bereits auf Grund von Untersuchungen an Amöben mit fluoresceinmarkiertem Albumin auf Konzentrationsvorgänge im Cytoplasma geschlossen.

Die Frage, welches Schicksal Inhalt und Begrenzung der Vakuolen nach Aufnahme in die Zelle erleiden, ist für die Einschätzung der physiologischen Bedeutung der Pz. von erheblicher Bedeutung (Holter 1959a, b). Die hier diskutierten Verhaltensweisen des Cytoplasmas — Extrusion und Konzentration — zwingen nun nicht zu der Annahme, daß hochmolekulare, unveränderte Proteine aus dem Medium jemals in unmittelbaren Kontakt mit dem lebenden Cytoplasma kommen, im Gegensatz zu niedermolekularen Bestandteilen, etwa radioaktiv markierter Glukose (Chapman-Andresen und Holter 1959), die bald nach Abschluß der Pz. diffus im Plasma nachweisbar ist. Auch andere kleine Moleküle mögen sehr bald die Pz.V. verlassen und am Zellstoffwechsel teilnehmen, worauf man vielleicht auch die im Vergleich zu Kontrollmedien besser konservierende Wirkung von K.P.Lsg. zurückführen darf. Dabei muß man berücksichtigen, daß der Vakuoleninhalt nicht identisch mit der Zusammensetzung des Immersionsmediums sein wird, da zwischen diesem und der Vakuolenbegrenzung als ehemaligem Bestandteil der Zellmembran durch Adsorption Gleichgewichtsverschiebungen eintreten, nachgewiesen an einer erhöhten Konzentration des Calciums (Danielli 1949) und von Proteinen auf Grund fluorescenzmikroskopischer Untersuchungen (Brandt 1958), sowie verschiedener Experimente mit radioaktivem Jod (Shumaker 1958). Die äußeren Hüllen der Zelle sind im übrigen mit der Membran nicht identisch (Monné 1946). Auf den Ablauf komplizierter Umbauvorgänge im Bereich der Pz.V. weist die Tatsache hin, daß ausschließlich an den verdichteten Vakuolen (Typ II) der Fluorescenzfarbstoff Akridinorange vorübergehend bis zur Rotfluorescenz konzentriert wird, ohne daß nach Verlust der Fluorescenz die Vakuolen im Phako morphologisch verändert erscheinen (Wittekind, unveröffentlicht). Für die Zellkulturen entwickelte Auffassung von Gey, Shopras et al. (1955), wonach Pz. V. in Mitochondrien umgewandelt werden können, hat sich hier kein Anhalt gefunden.

3. Adhäsionsfähigkeit. Hier läßt sich differieren a) zwischen der Adhärenz der Zellen an soliden Unterlagen, z.B. Glas oder Fibrin, wobei diese Oberflächen auf Form und Verhalten der L. Einfluß nehmen i.S. der contact guidance (P. Weiss 1958a) und b) der Adhäsion der Zellen untereinander, der Agglomeration.

a) Unsere Ergebnisse bestätigen die von Rinaldini (1958) und L. Weiss (1960) aus der Literatur gesammelten Erfahrungen über die zentrale Bedeutung des *Calciums* als Stabilisator der äußeren Zellschichten für das biologische Phänomen der Adhäsion, aber auch für die Zellbewegung und die Pz., die beide in den calciumfreien bzw -armen Lösungen weitgehend behindert sind — ein Hinweis

mehr auf den engen inneren Zusammenhang dieser drei, von der Zellmembran ausgehenden Leistungen der lebenden Zellen. Die Calciumabhängigkeit der Leukocytenbewegung bestätigt den gleichen an Amöben erhobenen Befund von Pantin (1926). Daß in einzelnen Fällen auch noch nach Dialyse eine geringe Adhärenz und Bewegung vorhanden sind, mag auf kleine Restmengen des Elementes in den Lösungen (etwa 0,05 mval in 28% Globulin nach Dialyse) und der erwähnten Speicherfunktion der Zelloberflächen für Calcium zurückzuführen sein, ferner vielleicht doch auf den fördernden Einfluß des konzentrierten Proteins. Von Owens (1957) werden 0,2 mg Ca/100 ml eines sonst calciumfreien Mediums als ausreichend für die Adhäsion angesehen. Weitere Untersuchungen über den Einfluß von Ionen und p_H-Wertverschiebung auf das Verhalten in K.P.Lsg. folgen später. — Offensichtlich ist die Haftfähigkeit unabhängig von dem nach Bauditsch (1957) notwendigen Fibrin, sowie von anderen Eiweißfraktionen des Serums.

b) Die Neigung der L. zur Agglomeration ist eine seit Jahrzehnten bekannte Eigenschaft (Schilling und Schultz 1923, v. Philipsborn 1925, 1928, 1930, Fritze 1956, Fleck 1946, Dittrich 1959). Sie beruht auf der Klebrigkeit der Leukocytenoberfläche, die sich vor allem bei in vitro-Untersuchungen oft störend bemerkbar macht (Tullis 1953). Durch K.P.Lsg. wird diese Agglomeration offensichtlich gefördert, sowohl im Studium intensiver Bewegung, als auch nach Abklingen derselben, kenntlich an der Bildung der großen Zellplaques aus abgerundeten Einzelelementen, die jedoch alle zunächst im negativen Phako bleiben — man könnte sie im Sinne von Tullis als Agglomeration von geschädigten Zellen bezeichnen (clumping) und jener von abgestorbenen (agglutination) gegenüberstellen, wobei der positive Phako vorherrscht.

Aus unseren Untersuchungen scheint hervorzugehen, daß die hohe Proteinkonzentration den Zellen die gegenseitige „Erkennung" erschwert; zwar wird auch in K.P.Lsg. die gegenseitige Abstoßung der Zellen (contact inhibition — Abercombie, Heaysman u. Mitarb. 1957, L. Weiss 1960) beobachtet, sie erfolgt aber sehr verzögert und oft erst nach breitflächiger Berührung, ferner spricht für eine Veränderung der Zelloberfläche das oft beobachtete Phänomen der Erythrocytophagocytose. Vielleicht ergeben sich hier interessante Beziehungen zu den erworbenen hämolytischen Anämien, bei denen Erythrophagocytose wiederholt beobachtet und mit einer Veränderung der Erythrocytenoberfläche durch Hämantikörper, also ebenfalls durch Globuline, erklärt wurde (Wasastjerna 1953, Schubothe und Müller 1955). — Wie different die beiden Proteine in konzentrierter Lösung die Zelloberflächen beeinflussen, zeigt das verschiedene Verhalten von L., M., Eosinophilen, Lymphocyten und Erythroycten in Globulin und Albumin.

Schlußbemerkungen. Die Reaktionen lebender Zellen auf Konzentrationssteigerungen der Proteine im Immersionsmedium scheint in mancher Hinsicht spezifisch zu sein. Eben deshalb könnte ihnen eine allgemeine Bedeutung zukommen, aber nur einige aus einer Vielzahl von Aspekten sind hier berücksichtigt worden.

So gehören zu den Problemen, die noch weiterer Klärung bedürfen, die Beziehungen zwischen Zellbewegung, Pinocytose und Phagocytose. Letztere beruht auf dem Zusammenwirken von aktiven Stoffwechselleistungen mit physika-

lisch-chemischen Oberflächenvorgängen und sicher findet sich hier eine weitgehende, aber doch wohl nicht vollständige Übereinstimmung mit dem Prozeß der Pz. Unterschiede bestehen zunächst insofern, als bei Phagocytose durch die aufzunehmende Substanz nur ein kleiner Sektor der Oberfläche, bei Pz. die gesamte Zellbegrenzung beteiligt sein muß; in unmittelbarem Zusammenhang damit dürfte die Gegensätzlichkeit zwischen Zellbewegung und Pz. stehen. Ferner verlangt das einmal aufgenommene Material verschiedene Stoffwechselleistungen von der Zelle im einen und im anderen Fall.

Sicher stehen bei Untersuchungen solcher Art die Eigenschaften der Zellmembran im Vordergrund. Weitere, in diesem Zusammenhang unmittelbar interessierende Probleme sind hier übergangen worden, etwa die erst neuerdings von Gropp (1956, 1960) betonte Bedeutung der Fermentausstattung von Zelloberflächen, sowie ihre Permeabilität gegenüber Wasser und Ionen. Dabei wird nicht übersehen, daß die Eigenschaftsänderung einer Zellstruktur nicht als isoliertes Phänomen betrachtet werden darf. — Schließlich wurde auf eine Erörterung chemotaktischer Einflüsse im Sinne von Menkin (1934), McCutcheon (1958) verzichtet, die vielleicht am Zustandekommen jener weitgespannten Protoplasmabrücken beteiligt sind.

Der Wert der Untersuchung von lebenden Zellen in isotonischen, konzentrierten Proteinlösungen dürfte unter anderem in ihrer Eigenschaft liegen, die Zellen vorübergehend zu intensiverer Tätigkeit anzuregen, womit Hinweise auf verborgene oder fehlende Zelleigenschaften gegeben werden können, etwa im Fall der Exsudat-Eosinophilen auf ihre Unfähigkeit zur Pz. bei gleicher Beweglichkeit dieser Eosinophilen und der neutrophilen L. — Substanzen mit aktivierenden Eigenschaften sind seltener als solche mit hemmenden, von denen wir eine große Zahl kennen (Lettré 1950, 1960, Sentein 1960, Verne 1955 u. a.)

Die Möglichkeit bietet sich an, mit konzentrierten Proteinmedien auch auf anderen Gebieten der experimentellen Zellforschung, etwa der Immuncytologie und der pharmakologischen Prüfung, zu arbeiten. Bei der Suche nach Aktivitätsunterschieden in Abhängigkeit von Organerkrankungen wird man berücksichtigen müssen, daß fördernde und hemmende Einflüsse mehr von plasmatischen als von zellulären Faktoren ausgehen (Ketchel und Favour 1955).

Zusammenfassung

Es wird über das Verhalten von lebenden Blut- und Exsudatzellen nach Immersion in 2%—40% isotonischen Lösungen von γ-Globulin und Albumin berichtet.

Insbesondere von den konzentrierten (20%—30%) γ-Globulinlösungen geht eine deutlich stimulierende Wirkung auf die Zellmotilität und die Pinocytose von Leukocyten, Monocyten und Exsudathistiocyten aus, in geringerem Maße auch auf ihre Adhäsionsfähigkeit an soliden Unterlagen, die in solchen Lösungen von der Anwesenheit der Calcium-Ionen abhängig, von anderen Serumeiweißfraktionen unabhängig ist.

Der Ablauf der Zellveränderungen nach Austausch des Kontrollmediums gegen die konzentrierte Proteinlösung wird beschrieben. Der Versuch wird begonnen, in diesem über etwa 10 Std bei Zimmertemperatur ablaufenden Prozeß Gesetzmäßigkeiten zu erkennen.

Glasadhärente Leukocyten lösen sich nach Kontaktnahme mit der konzentrierten Globulinlösung von der Unterlage ab und gehen in langgestreckte Formen mit starken amöboiden Bewegungen bei oft ausgedehnter Pseudopodienbildung über. Intensive Bewegung und Pinocytose sind Zellreaktionen, die sich weitgehend gegenseitig behindern. Die Aktionen der Monocyten sind langsamer, ihre Pseudopodien sind breiter. Auf dem Höhepunkt der Zelltätigkeit sind die Kerne der Monocyten deutlich angeschwollen.

Durch Pseudopodienformierung meist glasadhärenter Leuko- und Monocyten werden Tropfen der konzentrierten Proteinlösung in die Zellen aufgenommen. Die so neu gebildeten Pinocytose-Vakuolen (Typ I) können zusammenfließen, viele werden ausgestoßen, andere durch Wasserentzug konzentriert (Typ II).

Eosinophile Leukocyten des Blutes blieben in konzentrierter Proteinlösung unbeweglich, solche aus Exsudaten zeigen die gleiche Motilität wie neutrophile Leukocyten, jedoch keine Pinocytose. Lymphocyten, Mesothelien und Exsudat-Tumorzellen zeigen keine Reaktionen, die sich jenen der Leuko- und Monocyten vergleichen lassen.

Durch Immersion in Albumin lassen sich qualitativ ähnliche, quantitativ wesentlich geringere Wirkungen auf Zellmotilität und Pinocytose auslösen. Auffallend ist aber die mitunter ausgeprägte Pinocytosefähigkeit von Exsudathistiocyten. In konzentrierten Lösungen beider Proteine wird häufig Phagocytose der körpereigenen Erythrocyten beobachtet.

Die Zellagglomeration wird durch konzentrierte Proteinlösungen deutlich gefördert.

Es wird versucht, die Ergebnisse in die Erfahrungen der Zellphysiologie einzuordnen. Die Bedeutung der Zellmembranreaktionen für Motilität, Pinocytose und Adhärenz wird in der Diskussion hervorgehoben.

Literatur

Abercombie, M., and E. J. Ambrose: Interference microscope studies of cell contacts in tissue culture. Exp. Cell. Res. **15**, 332—345 (1958).

— J. E. M. Heaysman and H. M. Karthauser: Social behaviour of cells in tissue culture. III. Mutual influence of sarcoma cells and Fibroblasts. Exp. Cell Res. **13**, 276—291 (1957).

Andresen, N.: Cytological investigations on the giant amoeba chaos chaos L. C. R. Lab. Carlsberg, Sér. chim. **29**, Nr 26 (1956).

Barer, R., and S. Joseph: Refractometry of living cells. II. The immersion medium. Quart. J. micr. Sci. **96**, 1—26 (1955).

— — R. F. A. Ross and S. Tkaczik: Refractometry of living cells. Nature (Lond.) **171**, 720—722 (1953).

Bauditsch, W.: Beitrag zur Klebrigkeit der Leukocyten. Naturwissenschaften **44**, 238 (1957).

Bauer, K. F.: Methodik der Gewebezüchtung. Stuttgart: Hirzel 1959.

Becker, H. J., G. Munder u. H. Fischer: Über den Leukocytenstoffwechsel bei der Phagocytose. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **313**, 266—275 (1958).

Bernhard, W., H. Braunsteiner, H. L. Febvre et J. Harel: Les leucocytes du sang humain au microscope electronique. Presse méd. **158**, 482 (1950).

Bessis, M.: Traité de cytologie sanguine. Paris: Masson & Cie. 1952.

–, et M. Bricka: Etalement des leucocytes sur les films de plastique. C. R. Soc. Biol. (Paris) **143**, 375 (1949).

Brachet, J.: Biochemical cytology. New York: Academic Press 1957.

Brandt, P. W.: A study of the mechanism of pinocytosis. Exp. Cell Res. **15**, 300—313 (1958).

Carrel, A.: Modern techniques of tissue culture and results. Arch. exp. Zellforsch. **6** (1928).

Chalkley, H. W.: Changes in water content in amoeba in relation to changes in its protoplasmic structure. Physiol. Zool. **2**, 535—574 (1929).
Chapman-Andresen, C.: Some observations on pinocytosis in leucocytes. Exp. Cell Res. **17**, 197—204 (1959).
—, and H. Holter: Studies on the ingestion of C^{14}-glucose by pinocytosis in the amoeba. Exp. Cell Res. Suppl. **3**, 52—63 (1959).
— — The uptake of fluorescent albumin by pinocytosis in Amoeba proteus. J. biophys. biochem. Cytol. **8**, 288—291 (1960).
Crawford, G. N. C., and R. Barer: The action of formaldehyde on living cells as studied by phase-contrast microscopy. Quart. J. micr. Sci. **92**, No 4 (1951).
Danielli, J. F.: Research surface chemistry. Suppl. 87. London: Butterworth 1949.
De Bruyn, P. P. H.: Theories of amoeboid movement. Quart. Rev. Biol. **22**, 1—24 (1947).
De Robertis, E. D. P., W. W. Nowinski and F. A. Saez: General cytology, 3. edit. Philadelphia and London: W. B. Saunders Company 1960.
Dittrich, H.: Grundlegende Funktionen der neutrophilen Granulocyten. In: Physiologie und Pathologie der weißen Blutzellen von H. Braunsteiner. Stuttgart: Georg Thieme 1959.
Fermi, C.: Zbl. Bakt. **56**, 55 (1910). Zit. nach L. Weiss 1960.
Fleck, L.: Zellspezifische Ausagglutine als Regulatoren der zytologischen Zusammensetzung des Blutes. (Die Zytoordine.) Schweiz. med. Wschr. **76**, 175—177 (1946).
Fritze, L.: Das Abwehrsystem der neutrophilen Granulocyten. Dtsch. med. Wschr. **81**, 601—604 (1956).
Gey, G. O., P. Shapras and E. Borysko: Activities and responses of living cells and their components as recorded by cinephase microscopy and electron microscopy. Ann. N.Y. Acad. Sci. **58**, 1089—1095 (1954).
Gropp, A., u. H. Hupe: Fermenthistochemische Reaktionen an lebenden Zellen in Gewebekulturen. Klin. Wschr. **36**, 361—362 (1958).
Gropp, H.: On the localization of enzymes on the cell surface. I. Congr. Internat. d'Histochemie et de Cytochemie, Paris 1960.
Harrison, R. G.: The reaction of embryonic cells to solid structures. J. exp. Zool. **17**, 521—544 (1914).
Holfreter, J.: Phenomena relating to the cell membrane in embryonic processes. Exp. Cell Res. Suppl. **1**, 497—510 (1949).
— Studies on the diffusibility, toxicity and pathogenic properties of "inductive" agents derived from dead tissues. Exp. Cell Res. Suppl. **3**, 188—209 (1955).
Holter, H.: Pinocytosis. Int. Rev. Cytol. **9**, 481—504 (1959).
— Problems of pinocytosis with special regard to amoeba. Ann. N.Y. Acad. Sci. **78**, 524—537 (1959).
—, and J. M. Marshall: Studies on pinocytosis in the Amoeba chaos chaos L. C. R. Lab. Carlsberg, Sér. chim. **29**, 7—26 (1954).
Holtzer, H., and S. Holtzer: The in vitro uptake of fluorescein labelled plasma proteins. I. Mature cells. C. R. Lab. Carlsberg, Sér. chim. **31**, 373—408 (1960).
Ketchel, M. D., and C. B. Favour: The acceleration and inhibition of migration of human leucocytes in vitro by plasma protein fractions. J. exp. Med. **101**, 647—663 (1955).
Kleier, A.: Experimentelle Untersuchungen über den Abbau der hyalinen Tropfen nach Eiweißspeicherung in der Niere von Salamandra maculosa. Beitr. path. Anat. **103**, 559 (1939).
Kohn, J.: A simple method for the concentration of fluids containing protein. Nature (Lond.) **183**, 1055—1056 (1959).
Kosenow, W.: Lebende Blutzellen im Fluorescenz- und Phasenkontrastmikroskop. Suppl. ad Acta haemat. (Basel) H. **4** (1956).
Lettré, H.: Über Mitosegifte. Ergebn. Physiol. **46**, 379 (1950).
— Zusammenfassung der experimentellen Arbeiten über antimitotische Chemotherapie. Antibiot. et Chemother. (Basel) **8**, 166—193 (1960).
—, M. Albrecht u. R. Lettré: Verhalten von Fibroblasten unter aeroben und anaeroben Bedingungen. Naturwissenschaften **38**, 504 (1951).
— — — Auslösung von Plasmabewegungen in Ruhezellen. Naturwissenschaften **38**, 505 (1951).

Lewis, W. H.: Pinocytosis. Bull. Johns Hopk. Hosp. **49**, 17—27 (1931).
— Pinocytosis by malignant cells. Amer. J. Cancer **29**, 666—679 (1937).
— The role of a superficial plasmagellayer in changes of form, locomotion and division of cells in tissue culture. Arch. exp. Zellforsch. **23**, 1—7 (1939).
— Some cultural and cytological characteristics of normal and malignant cells in vitro. Arch. exp. Zellforsch. **23**, 8—26 (1939).
Mast, S. O.: Structure, movement, locomotion and stimulation in amoeba. J. Morph. and Physiol. **41**, 347—425 (1926).
— Locomotion in Amoeba proteus (Leidy). Protoplasma **14**, 322—330 (1932).
Mc Cutcheon: Chemotaxis and locomotion of leucocytes. Ann. N.Y. Acad. Sci. **59**, 941—950 (1955).
Menkin, V.: Factors concerned in the motilization of leucocytes in inflammation. Ann. N.Y. Acad. Sci. **59**, 956—985 (1955).
Monné, L.: Struktur- und Funktionszusammenhang des Cytoplasmas. Experientia (Basel) **7**, 153—196 (1946).
Pantin, C. F. A.: On the physiology of amoeboid movement. Brit. J. exp. Biol. **3**, 275—312 (1926).
Philipsborn, E. v.: Phagocytoseversuche an Leukocyten von gesunden und kranken Menschen. Dtsch. Arch. klin. Med. **145**, 351—359 (1924).
— Untersuchungen über die weißen Blutzellen auf dem geheizten Objekttisch. Dtsch. Arch. klin. Med. **146**, 345—354 (1925).
— Untersuchungen über die amöboiden Bewegungen der Leukocyten gesunder und kranker Menschen im Quarzdeckglaspräparat. Dtsch. Arch. klin. Med. **160**, 323—347 (1928).
— Untersuchungen über den Erregungszustand der Leukocyten gesunder und kranker Menschen. Dtsch. Arch. klin. Med. **168**, 239—243 (1930).
Pilery, A., L. Ledoux et F. Vanderhaeghe: Etude de l'absorption de la ribonucléase par les cellules de la moelle osseuse et par des cellules des tumours d'ascites. Exp. Cell Res. **17**, 218—226 (1953).
Policard, A., et M. Bessis: Etude sur l'étalement vivant en pathologie cellulaire. L'emploi de la cinematographie en contraste de phase. Rev. Hémat. **8**, 57—70 (1953).
Randerath, E.: Über den Ort der Eiweißausscheidung in der Niere bei nephrotischen Nierenkrankheiten, nebst Bemerkungen über den Begriff und die Einteilung der Nephrosen. Beitrag path. Anat. **95**, 403 (1935).
— Die Entwicklung der Lehre von den Nephrosen in der pathologischen Anatomie. Ergebn. allg. Path. path. Anat. **32**, 91 (1937).
— Nephrose-Nephritis. Klin. Wschr. **281**, 305 (1941).
— Zur pathologischen Anatomie der sog. Amyloidnephrose. Zugleich ein Beitrag zur Frage der allgemeinen Amyloidose als Paraproteinose. Virch. Arch. **314**, 388—459 (1947).
Remmele, W.: Atmung und Glykolyse der Leukocyten. Inaug.-Diss. Frankfurt a. M. 1955.
Rinaldini, L. M. J.: The isolation of living cells from animal tissues. Int. Rev. Cytology **7**, 587—647 (1958).
Sandritter, W., H. Fischer, K. Süssenberger u. H. G. Schiemer: Quantitative histochemische Untersuchungen zum Nachweis der Proteinspeicherung von Mäuseascitestumorzellen. Exp. Cell Res. **17**, 197—204 (1959).
Schechtmann, A. M.: Uptake and transfer to macromolecules by cells with special reference to growth and development. Int. Rev. Cytol. **5**, 303—322 (1956).
Schilling, V., u. E. Schultz (1923): Zit. nach v. Philipsborn.
Schubothe, H., u. W. Müller: Über die Anwendbarkeit des Ehrlichschen Fingerversuches als Nachweismethode intravitaler Hämolyse und Erythrocytophagocytose bei hämolytischen Erkrankungen. Klin. Wschr. **33**, 272—276 (1955).
Sentein, P.: L'action antimitotique et caryoclasique de substances chimiques. Colloques Internat. du Centre nat. Rech. Scientif. Montpellier 1959.
Shumaker, V. N.: Uptake of protein from solution by the Amoeba proteus. Exp. Cell Res. **15**, 314—331 (1958).
Tullis, J. L.: Blood cells and plasma proteins. New York: Acad. Press Inc. 1953.
Verne, J.: Cellular sensitivity to drug action in short term tissue cultures. In vitro correlations with sensitivity in vivo. Ann. N.Y. Acad. Sci. **58**, 1195—1201 (1955).

Warburg, O.: Partielle Anaerobiose der Krebszellen und Wirkung der Röntgenstrahlen auf Krebszellen. 100. Verh. Dtsch. Ges. Naturforsch. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959.

Wasastjerna, C.: Immunhaemolytic mechanisms in vivo. The mode of destruction of sensitized red cells in the living organism. Blood **8**, 1042—1051 (1953).

Weber, H. H.: Über ATP und die Kontraktilität von Muskeln und Zellen. Eiweißsymposion Tübingen 1953. Dtsch. med. Wschr. **78**, 1417 (1953).

Weiss, L.: The adhesion of cells. Int. Rev. Cytol. **9**, 187—225 (1960).

Weiss, P.: Cell contact. Int. Rev. Cytol. **7**, 391—423 (1958).

Wittekind, D.: Die Vitalfärbung des Mäuseascitescarcinoms mit Acridinorange. Z. Zellforsch. **49**, 58—104 (1958).

— Über die derzeitige Bedeutung der Vitalfärbung, speziell der Vitalfluorochromierung in der Cytologie und über Möglichkeiten ihrer weiteren Anwendung, insbesondere in Kombination mit anderen Methoden. Mikroskopie **14**, 9—25 (1959).

— Die kombinierte Phasenkontrast-Fluorescenzmikroskopie als Untersuchungsmethode bei Pinocytose- und Phagocytosevorgängen. I. Congr. Internat. d'Histochimie et de Cytochimie, Paris, 1960.

— Über Entstehung, Morphologie und gegenseitige Beziehungen intraplasmatischer Vacuolenbildungen in lebenden Tumorzellen aus Ergüssen seröser Höhlen. Virchows Arch. path. Anat. **333**, 311—342 (1960).

— Untersuchungen zur Frage der Eiweißaufnahme in kernhaltigen Zellen des peripheren Blutes und in Ergußhistiocyten (Pinocytose). Schweiz. med. Wschr. **44**, 1264 (1960).

Zollinger, H. U.: Cytologic studies with the phase microscope. I. The formation of "blisters" on cells in suspension (potocytosis) with observations on the nature of the cellular membrane. Amer. J. Path. **24**, 545 (1948).

Priv.-Doz. Dr. D. Wittekind,
Deutsche Hoffmann-La Roche AG., Grenzach/Baden,
Medizinisch-wissenschaftliche Abteilung

Zeitschrift für Zellforschung 54, 654—676 (1961)

Departamento de Ultraestructura Celular, Instituto de Investigación de Ciencias Biologicas, Avenida Italia 3318, Montevideo, Uruguay

ELECTRON MICROSCOPE OBSERVATIONS ON CHEMO- AND MECHANO-RECEPTOR CELLS OF FISHES

By

O. Trujillo-Cenóz

With 22 Figures in the Text

(Received February 13, 1961)

Introduction

Stimuli arising from the external environment as well as those originating at visceral or muscular level are recorded by a specialized part of the nervous system: the sense organs. In spite of their morphological and functional differences these organs have the common property of transducing physical or chemical events into nerve impulses.

During the last few years electronmicroscopists have devoted special attention to the fine structure of photoreceptor cells. Information is now accumulating rapidly and it can be anticipated that within a short time important advances will be made, in connection with the structure and function of vertebrates and invertebrates visual system.

On the other hand, our knowledge on other types of vertebrate sensory cells is limited to the findings reported in relatively few papers, dealing with receptor organs of mammals. With the exception of Bloom's work (1954) and a recent paper of Lowenstein and Wersäll (1959), chemo- and mechano-receptor organs of low vertebrates still remain unexplored.

If regarded phylogenetically, Pisces appear as the most primitive group of the vertebrate *Phylum* and thus they represent a promissory field for investigating elementary organized receptor organs.

This paper deals with the fine structure of some chemo- and mechano-receptor cells found in three species of fish (*Corydoras paleatus*, Jen., *Cnesterodon decemmaculatus*, Jen., *Fitzroyia lineata*, Jen.). Taste buds were studied in the food finding barbels of *Corydoras* while the olfactory epithelium, the neuromasts of the lateral line system and the sensory epithelium of the semicircular canals were examined in fully developed embryos of *Cnesterodon* and *Fitzroyia*.

Material and methods

The food finding barbels of adult specimens of *Corydoras paleatus* were cut off with a pair of sharp scissors and immediately immersed in a 1% osmic acid solution in veronal buffer (p_H 7.6) at 0° C. After 2 hours fixation the pieces were dehydrated in the graded series of alcohols and embedded as usual in n-butyl methacrylate. Full developed embryos of *Cnesterodon decemmaculatus* and *Fitzroyia lineata* were fixed and embedded following the same procedure. Sections were made in a Porter-Blum microtome (mechanical system) and mounted on Formvar coated grids.

Thick sections (0,25μ) were observed under a phase contrast microscope after the removal of methacrylate. Electronmicrographs were obtained in a RCA EMU 2C electron microscope at original magnifications of 2000 to 10000×.

Observations

A. Chemoreceptor cells

I. Taste cells of *Corydoras paleatus*. In mammals the taste cells are restricted to the epithelium lining the anterior region of the alimentary canal, but in many

Fig. 1. Low magnification micrograph illustrating the arrangement of the receptor cells within a taste bud of *Corydoras paleatus* (only the apical and medial region of these cells were included in the section). The receptor cells (*R.C.*) are characterized by their small diameter and by the presence of rows of elongated mitochondria. Towards the base of the bud the cytoplasm of the receptor cells contains increased amounts of vesicles and thin tubules. Note that sensory cells are enveloped by light and large sustentacular cells (*S.C.*). 4000 ×

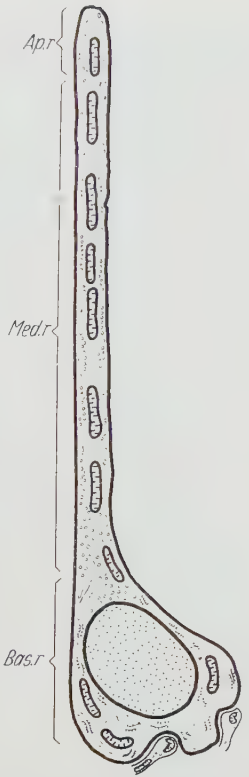


Fig. 2. Diagram of a taste receptor cell of *Corydoras paleatus* showing the distribution of cytoplasmic material at different levels of the cell. (*Ap. r.*) apical region; (*Med. r.*) medial region; (*Bas. r.*) basal region

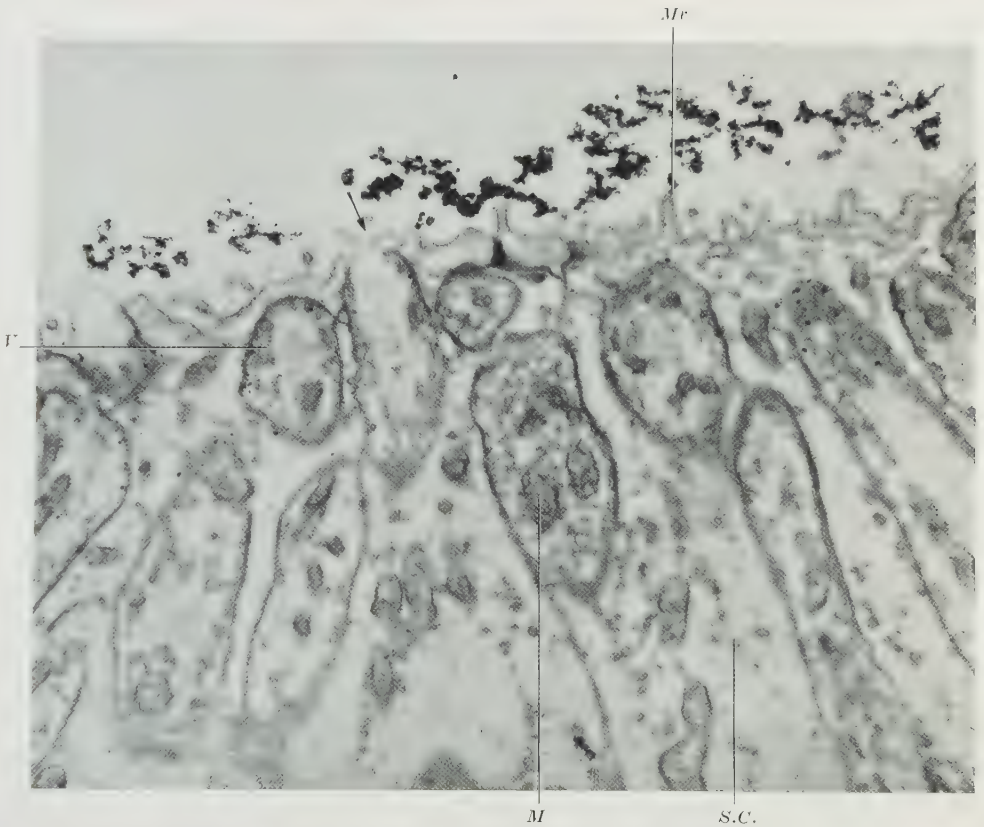


Fig. 3. Electronmicrograph showing a section through the apical region of a taste bud of *Corydoras*. One of the taste cells (arrow) reaches the surface of the bud and projects into the environment by means of two short and ill-defined microvilli. Immersed in a light matrix there are profiles of vesicles (*V*) and mitochondria (*M*). As can be seen in this picture, the sustentacular cells (*S. C.*) also bear short microvilli (*Mv*). 20000 ×

Teleosts they occur scattered over the head, on the food finding barbels and they can even be found at the base of the fins. Sensory elements are always found together with the so-called sustentacular cells, both types of cells forming small barrel-like organs (taste buds, burgeon gustatifs), which occupy the entire thickness of the epithelium (Fig. 1).

The taste cells of *Corydoras* are pear-shaped (Fig. 2) and extend from the basal to the free surface of the bud. To facilitate description each cell will be devided into three regions, 1. the apical region, 2. the medial region, and 3. the basal region.

1. The apical region. The sensory cell terminates at the surface of the bud by means of a cylindrical or tapered extremity. Occasionally sensory cells bear scarce, thin, and short microvilli (Fig. 3). These, unlike those found in rabbit's taste cells are poorly developed and look as ill-defined structures (Engström and Rytzner 1956; Trujillo-Cenóz 1957; de Lorenzo 1958). At this level, rows of vesicles and thin tubules can be seen arranged along the cell membrane. The remainder of the cytoplasm consists of a fine filamentous matrix in which one or two large mitochondria are immersed.

2. The medial region. This portion of the cell extends without sharp boundaries between the apical and the basal regions. In its distal segment, like in the apical region, vesicular and tubular structures are distributed in the peripheral cytoplasm (Fig. 4) while elongated mitochondria are seen aligned along the axis of the cell. Towards the basal region, increased amounts of vesicles and tubules gradually fill the cytoplasm. Finally at a level close to the nucleus, these structures are seen occupying the whole section of the cell (Fig. 5). It is assumed that tubules and vesicles represent a specialized form of the E. R. and may provide the cell with a large internal membrane surface particularly apt to facilitate the action of enzymes. In addition to these tubules and vesicles the cytoplasm contains membranes and vesicles pertaining to a well developed Golgi complex (Fig. 6).

3. The basal region. The nucleus is the most prominent component of this cellular region. It is limited by a folded double membrane and contains a fine granular chromatic material. The nucleolus is a dense mass lying in the center of the nucleus. In the cytoplasm scarce profiles of E. R. cisternae are seen together with mitochondria and clusters of minute granules. Although the contacts between the sensorial nerve fibers and the receptor cells take place at this level, there is no specialization of the cell membrane nor is there accumulation of mitochondria or vesicular material.

The sensory fibers. Optical and electronmicroscopical studies demonstrate a great number of nerve fibers concentrated underneath the basal pole of *Corydoras*' taste buds (Fig. 7). These fibers are enveloped by large, light glial cells and their axoplasm contains mitochondria and vesicles (Fig. 8). Nerve fibers and glial processes constitute small plexuses from which relatively few fibers arise. These, after a short course terminate on the surface of the sensory cells by means of a club-like swelling containing mitochondria and a few vesicles.

II. Olfactory neurons of *Cnesterodon decemmaculatus* and *Fitzroyia lineata*. The olfactory pit of fishes is lined by a pseudostratified and columnar epithelium (Fig. 9) consisting of two types of cells: the olfactory cells and the sustentacular cells. The olfactory cells are bipolar neurons which represent primary sensory cells comparable to those found in the spinal and cranial ganglia. Each neuron

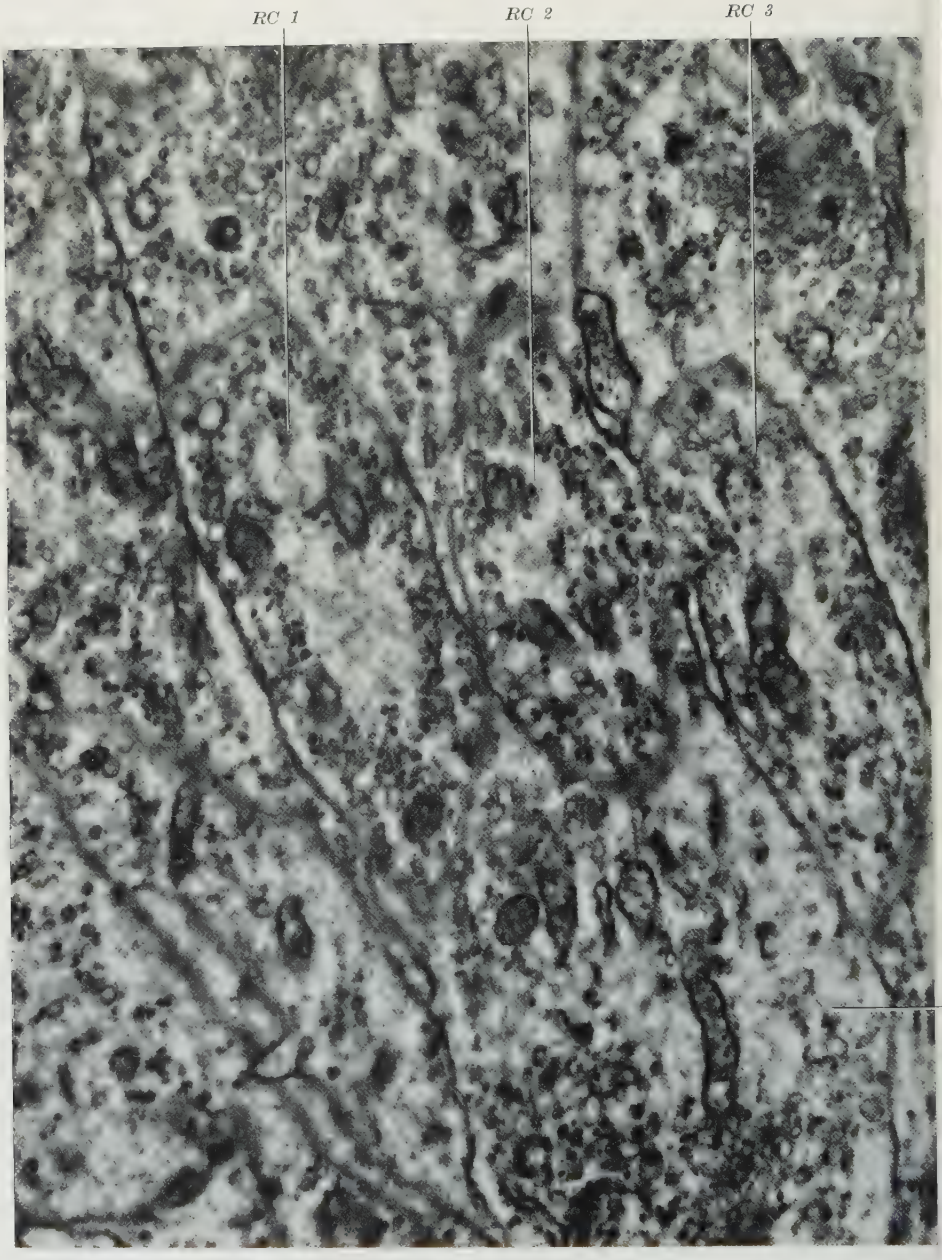


Fig. 4. An oblique section through the medial region of three taste receptor cells (*RC 1*, *RC 2*, *RC 3*) of *Corydoras paleatus*. At this level a great amount of vesicles and tubules are concentrated in the peripheral cytoplasm. (*S.C.*) sustentacular cells. 23000 ×

sends towards the surface of the epithelium a slender cylindrical process or dendrite which terminates in a knob-like swelling (olfactory knob). A fine axon arises from the basal pole of the neurons and follows a meandering course among the sustentacular cells up to the lamina propria. A separate description of the olfactory knob, dendrite, soma and axon is given below.

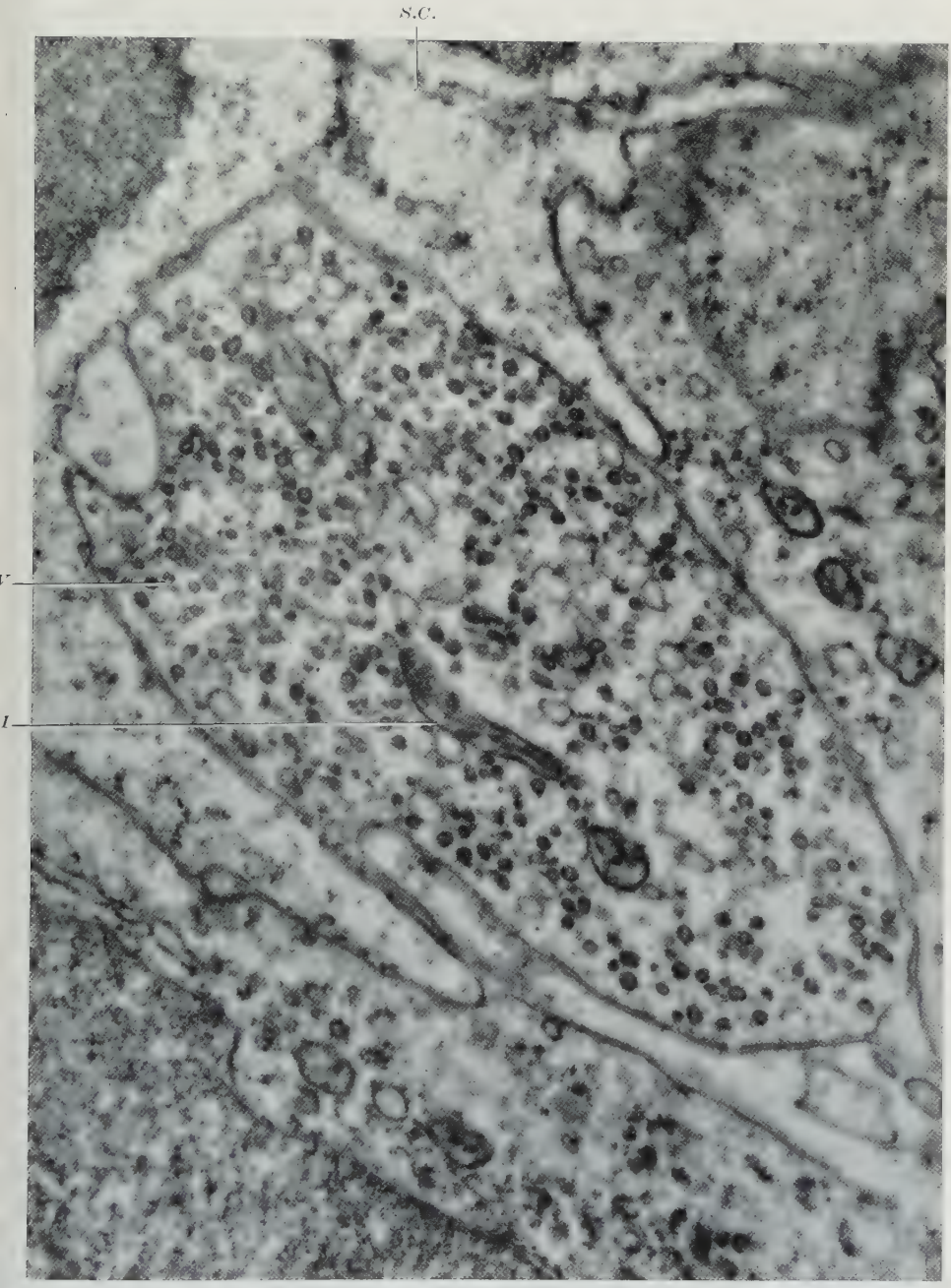


Fig. 5. Electronmicrograph showing a transverse section through a taste receptor cell of *Corydoras*. (The level of this section is below that illustrated in the preceding picture). The cytoplasm of the cell is filled with a large amount of vesicles (*V*) and tubules. Note that vesicles are denser than the cytoplasmic matrix. (*M*) mitochondria; (*S.C.*) sustentacular cells. 28 600 ×

The olfactory knob. Images like the one illustrated in Fig. 10 clearly show that the so called "olfactory knob" is merely an apical swelling of the dendrite.

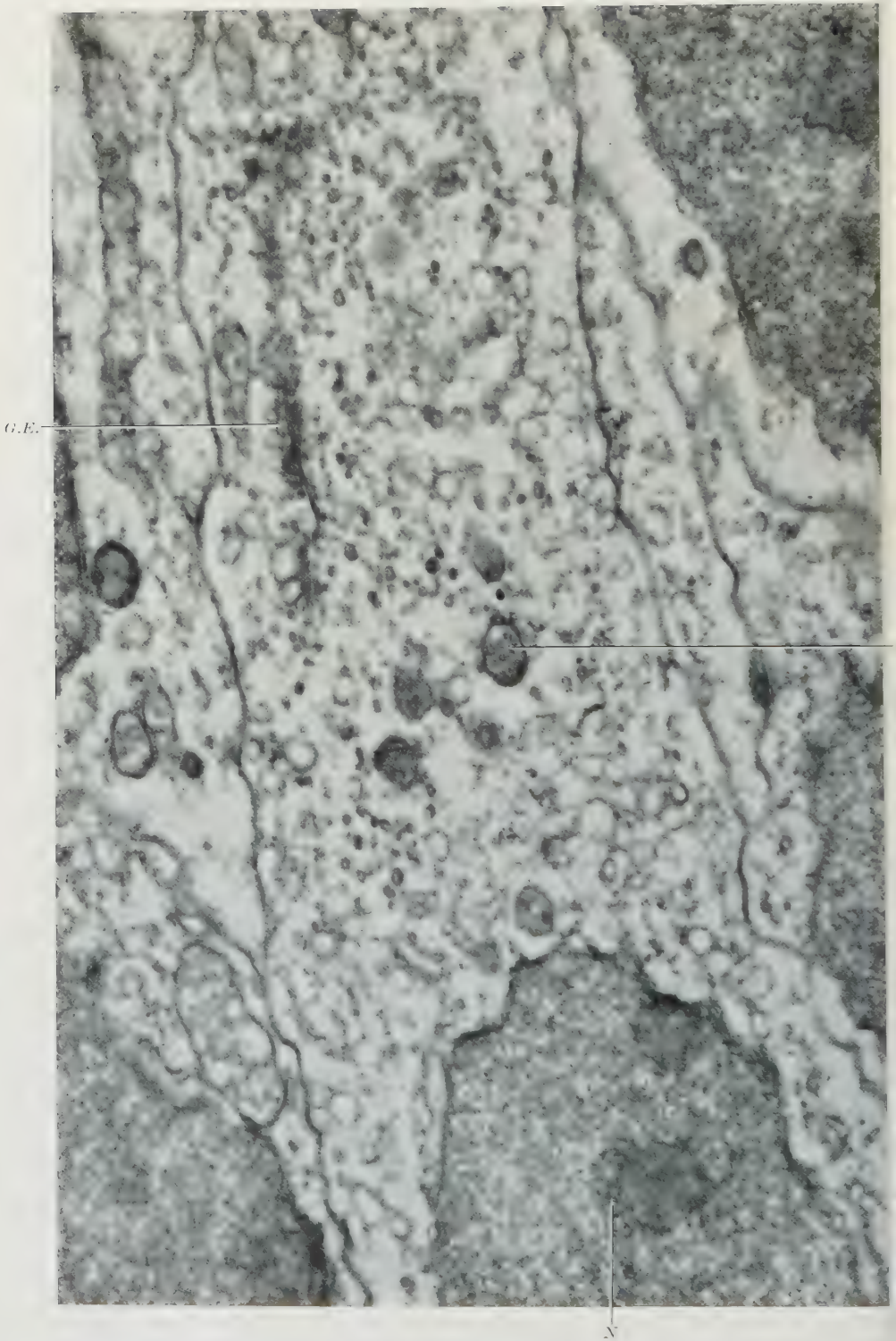


Fig. 6. Longitudinal section through a taste cell of *Corydoras*. In this picture profiles of membranes and vesicles of Golgi nature (*G.E.*) are seen together with multivesicular bodies (*Mv. B*). (*N*) Nucleus.
24 500 ×

An undetermined number of cilia arise from this region and project into the lumen of the olfactory pit. At the point where the cilia join the dendrites it is possible to

Fig. 7. Low magnification picture illustrating the basal pole of a taste bud of *Corydoras*. (*N.F.*) nerve fibers; (*R. C.*) receptor cells. 16300 ×

observe typical basal bodies. These structures are also found scattered within the cytoplasm of the knob intermixed with thin canalicules of the E. R. system. Frequently, longitudinal or cross section of cilia show that many of them do not exhibit their characteristic inner structure (nine pairs of peripheral filaments and a central pair). This fact can be explained considering that we have worked with

embryonic tissues while the tipical arrangement of filaments within the cilium is the final step in a complicated growth process. (Sotelo and Trujillo-Cenóz 1958).

The dendrite. In the electronmicrographs the dendrite is characterized by the presence of numerous thin tubules (de Lorenzo 1957) about 300 Å wide aligned

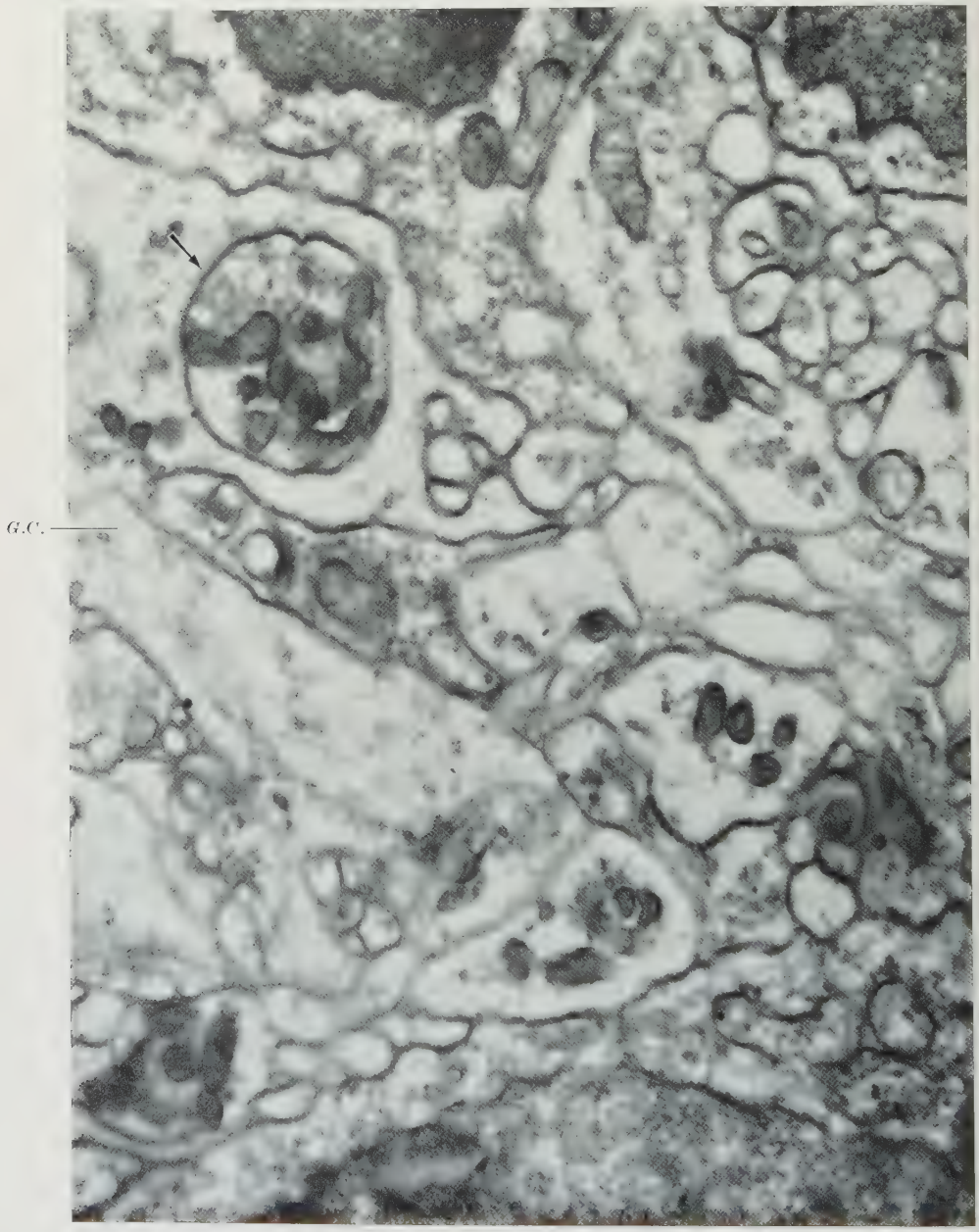


Fig. 8. This picture shows the fine structure of the sensorial nerve fibers innervating the taste buds of *Corydoras* at a higher magnification. Note that one of the fibers (arrow) contains several mitochondria and microvesicular material. The nerve fibers are enveloped by large and pale glial cells (*G.C.*). 28600 ×

parallel to its length (Fig. 11). Profiles of large vesicles and dense bodies of a probable lipidic nature are seen in the peripheral cytoplasm.

The soma or perikaryon. The olfactory cells have a small perikaryon which is almost entirely occupied by the nucleus. In the region which could be considered as transitional between soma and dendrite it is possible to localize profiles of membranes and vesicles of Golgi nature. In these neurons as well as in those of the cerebral cortex (Schultz, Maynard and Pease 1957) the E. R. does not ex-

Fig. 9. Phase contrast photomicrograph of the olfactory epithelium of *Cnesterodon decemmaculatus*. In the lumen of the olfactory pit small dots are seen which correspond to sections of cilia arising from the olfactory neurons. (*B.V.*) blood vessel. 360 ×

hibit parallel aggregation of membranes like those seen in the Nissl bodies (Palay and Palade 1955). The nucleus is oval in shape and contains a fine granular material distributed at random in the nucleoplasm; frequently a large nucleolus is seen in its central region.

The axon. The olfactory axons start from the pole of the cells opposite to the distal processes (Fig. 12) and run towards the sub-mucosa enveloped by the sustentacular cells. Two morphological facts characterize the intraepithelial segment of olfactory fibers. The first is the being of small diameter (about 2 μ) and the second is the presence of a large number of mitochondria.

As can be seen in Fig. 13 near the basement membrane there are groups of olfactory axons encased in the surface of the sustentacular cells (basal type). This fact is in accordance with the observations made by Gasser (1956) in the olfactory epithelium of the pig.

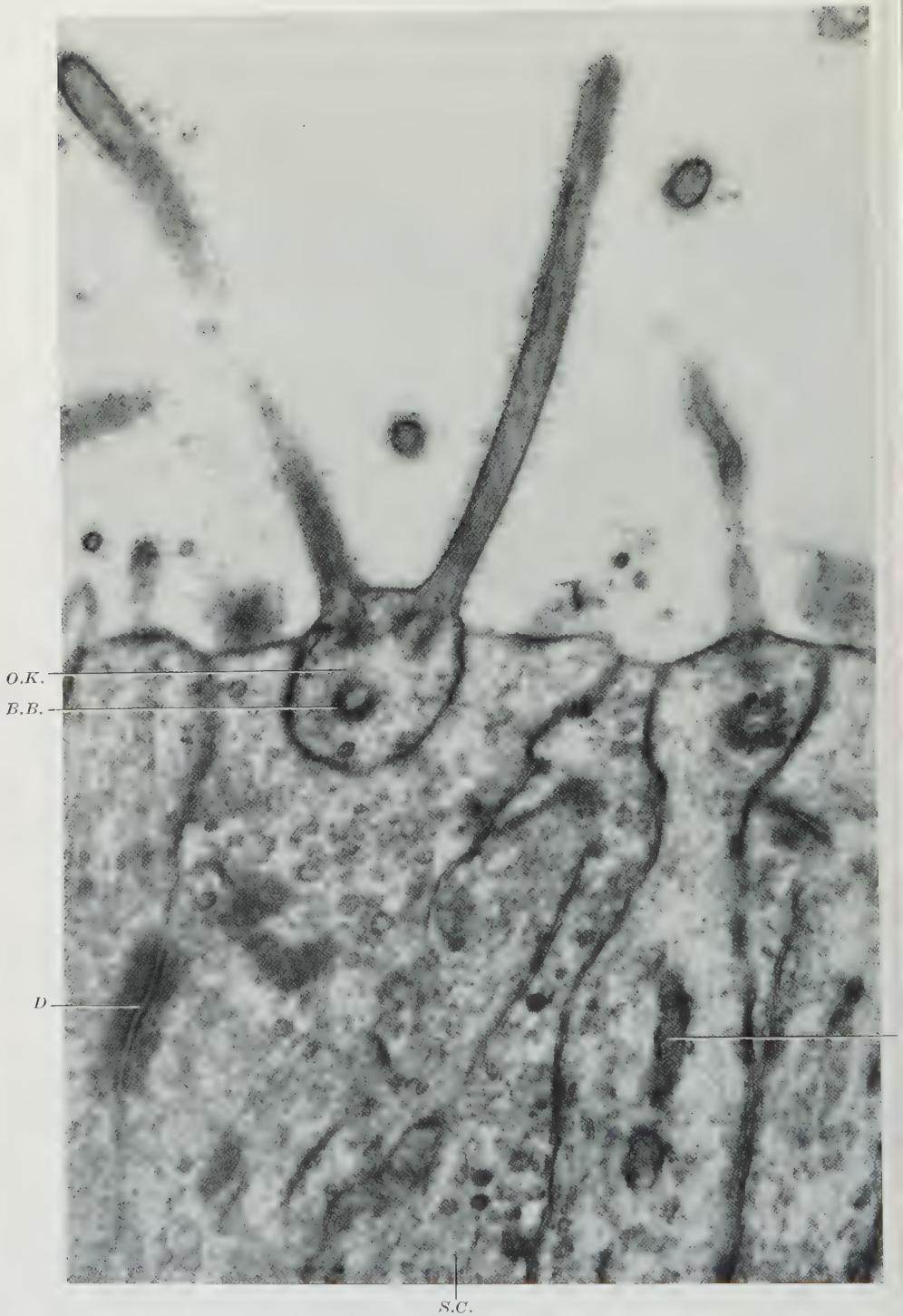


Fig. 10. Electronmicrograph illustrating the fine structure of the distal segment of the olfactory dendrites. Long cilia arise from the olfactory knob (*O.K.*) and project into the lumen of the olfactory pit. The cytoplasm of the dendrite contains basal bodies (*B.B.*) and tubular structures; (*M*) mitochondria; (*D*) desmosome; (*S.C.*) sustentacular cells (*Fitzroyia lineata*). 35 000 ×

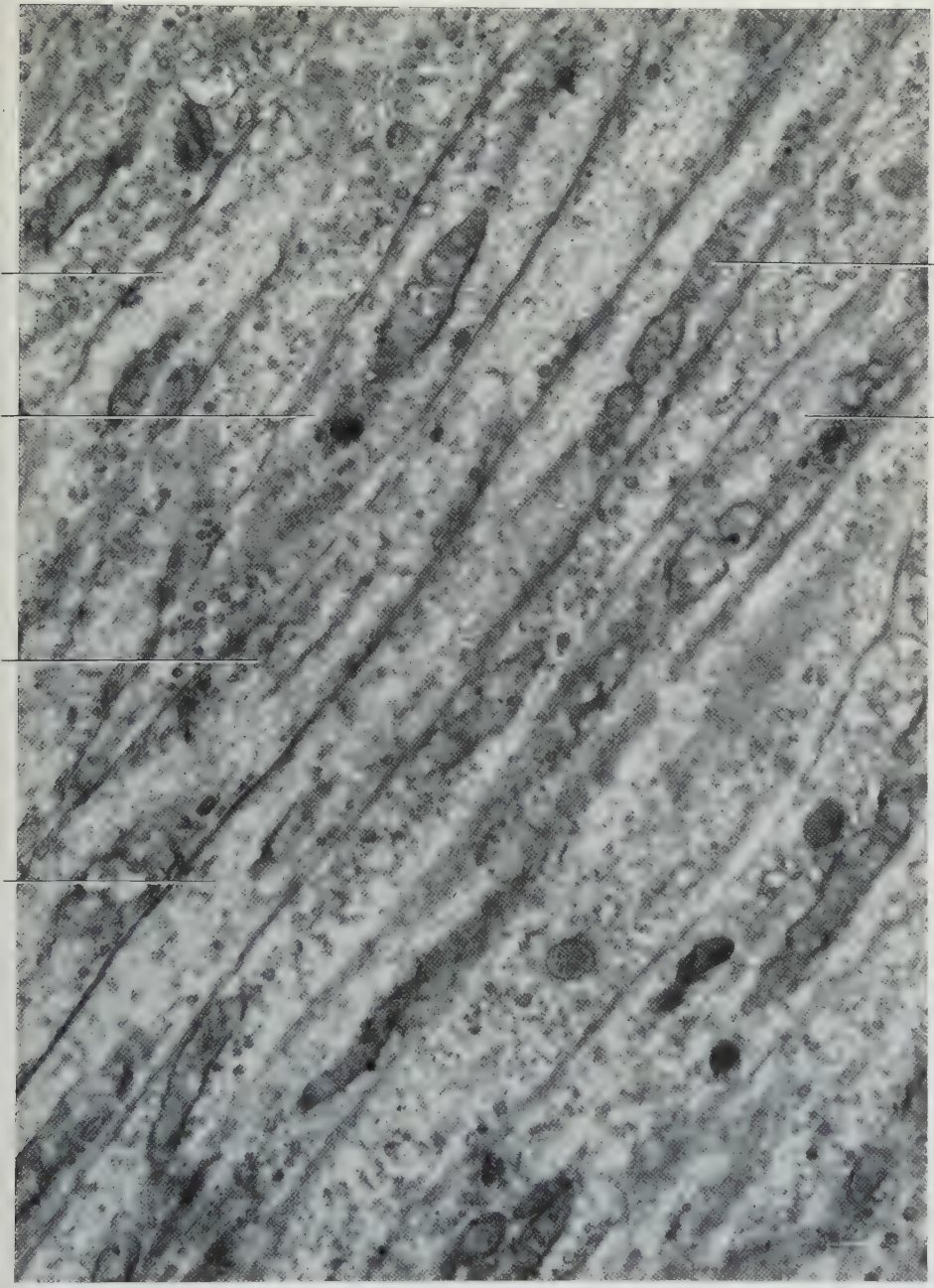


Fig. 11. Electronmicrograph showing longitudinal sections of several olfactory dendrites (*OD1*, *OD2*, *OD3*, *OD4*, *OD5*). The cytoplasm contains rows of mitochondria (*M*) and small tubules oriented parallel to the cell axis. 24500 ×

B. Mechano-receptor cells

I. Sensory cells of the lateral line system of *Cnesterodon decemmaculatus* and *Fitzroyia lineata*. Some aspects of the ultrastructural organization of

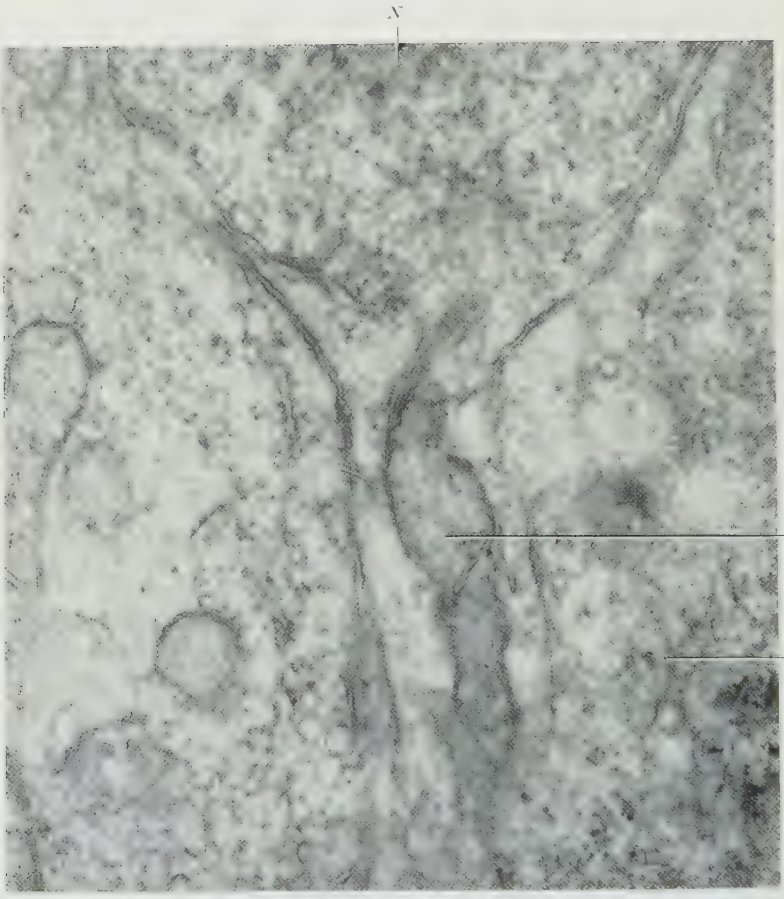


Fig. 12

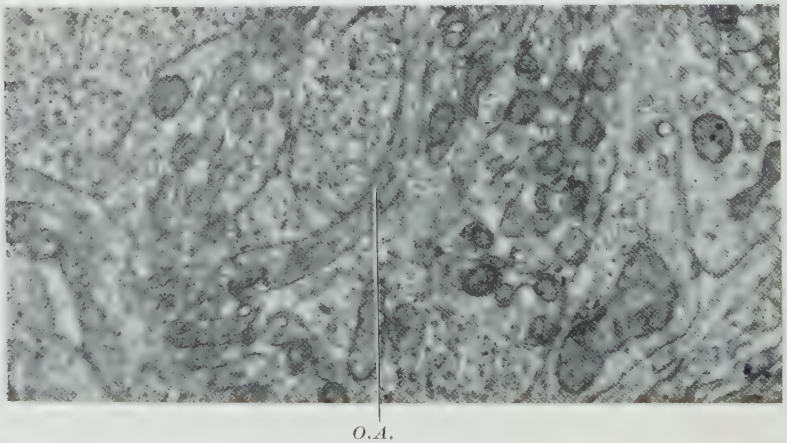


Fig. 13

Fig. 12. This picture shows the region of an olfactory neuron from which the axon arises. It is also possible to observe a short segment of its intraepithelial path. Note the presence of a large mitochondrion (*M*) occupying the central portion of the axon. (*S.C.*) sustentacular cells, (*N*) nucleus. 42000 ×

Fig. 13. Portion of a sustentacular cell (basal type), in which several olfactory axons (*O.A.*) are embedded. 8000 ×

neuromasts were reported in a previous paper (Trujillo-Cenóz 1960). This study only concerns the fine structure of sensory cells and nerve fibers present in the supra-and infra-orbitary neuromasts of *Cnesterodon* and *Fitzroyia* embryos. Sensory cells will be divided into three regions: 1. the apical region, 2. the medial region, and 3. the basal region.

1. The apical region. It is characterized by the presence of the so-called "sensory hairs". These elements are covered "in vivo" by a jelly-like cap (the cupula) but fixation and embedding destroy the normal relationship existing between the cupula and the sensory hairs. As revealed by the electronmicroscope, the majority of these hairs can be identified with microvilli; only a few of them show the inner structure which characterizes cilia. It is highly probable that each sensory cell, like those of the vestibular epithelium, bears only one cilium. Longitudinal sections of the sensory cells show that microvilli are limited by a membrane continuous with the cell membrane. Our electronmicrographs have failed to demonstrate any specialized axial structure comparable to those found in other mechano-receptor hairs (Iurato 1960). Directly beneath the apical membrane, in the region where microvilli arise there exists a fine fibrillar substance, which could be considered as constituting a primitive type of "cuticular plate" (Fig. 14). Elongated mitochondria together with vesicles and dense granules are found scattered in the cytoplasm. A small Golgi complex consisting of a few membranes and vesicles lies close to the nuclear region.

2. The medial region. This region contains a large oval nucleus limited by a folded membrane. The chromatic substance consists of minute and dense granules distributed at random in the nucleoplasm. One or two dense masses, of a probably nucleolar nature, can be observed frequently in the center of the nucleus.

The cytoplasm is limited to a narrow perinuclear band in which profiles of E. R. cisternae, mitochondria and scarce vesicles are the most conspicuous elements.

3. The basal region. As can be seen in Figs. 15—16 large amounts of vesicles are concentrated in this portion of the cell. Mitochondria and thin tubules are also found intermixed with the vesicular material. It is assumed that these elements integrate the E. R. system. The cell membrane is depressed by the sensorial nerve fibers, occasionally the nerve fibers are seen deeply recessed in the surface of the sensory cells (Fig. 15).

The sensory fibers. The sensory fibers innervating the neuromasts originate from thin medullated nerves which run in the connective tissue beneath the tegument. Some of these nerves pierce the basement membrane, lose their myelinic sheaths and hence follow their course enveloped by the sustentacular cells. These sensory fibers terminate on the basal region of receptor cells. Three main types of neuro-epithelial junctions were observed (Fig. 17): in the first one, the fiber, on approaching the receptor element, becomes thicker in diameter and finally constitutes a calyx which embraces the basal pole of the cell; in the second one the nerve ending is deeply recessed in the surface of the sensory cell. (These two types of nerve endings insure a large surface of contact between the fiber and the receptor cell). The third type is characterized by the presence of small "boutons terminaux" in close contact with the receptor cell membrane. Within the fibers are numerous mitochondria and small amounts of vesicles. These structures

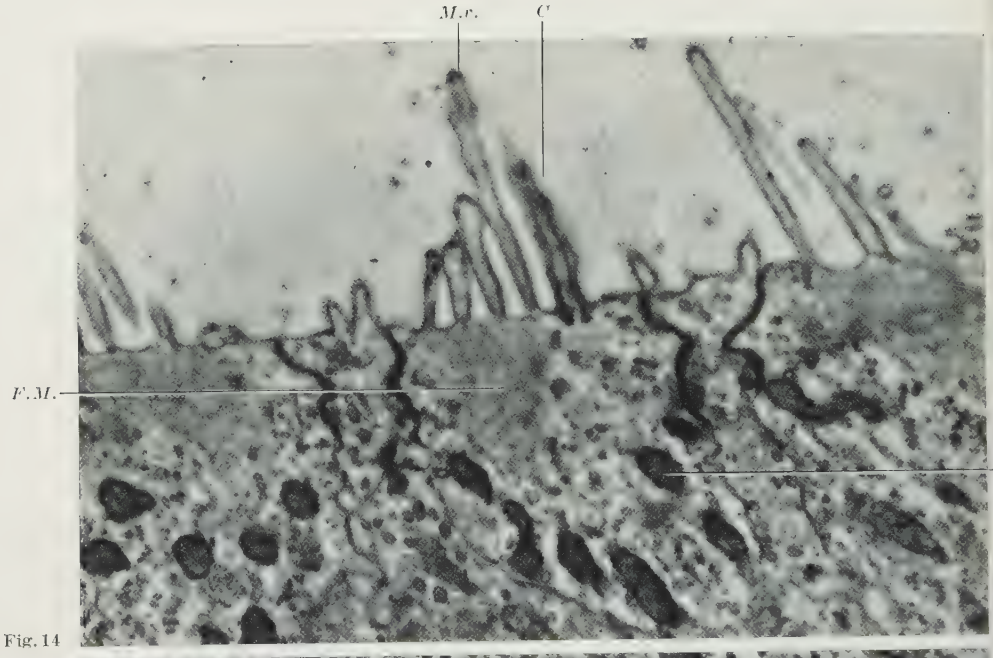


Fig. 14

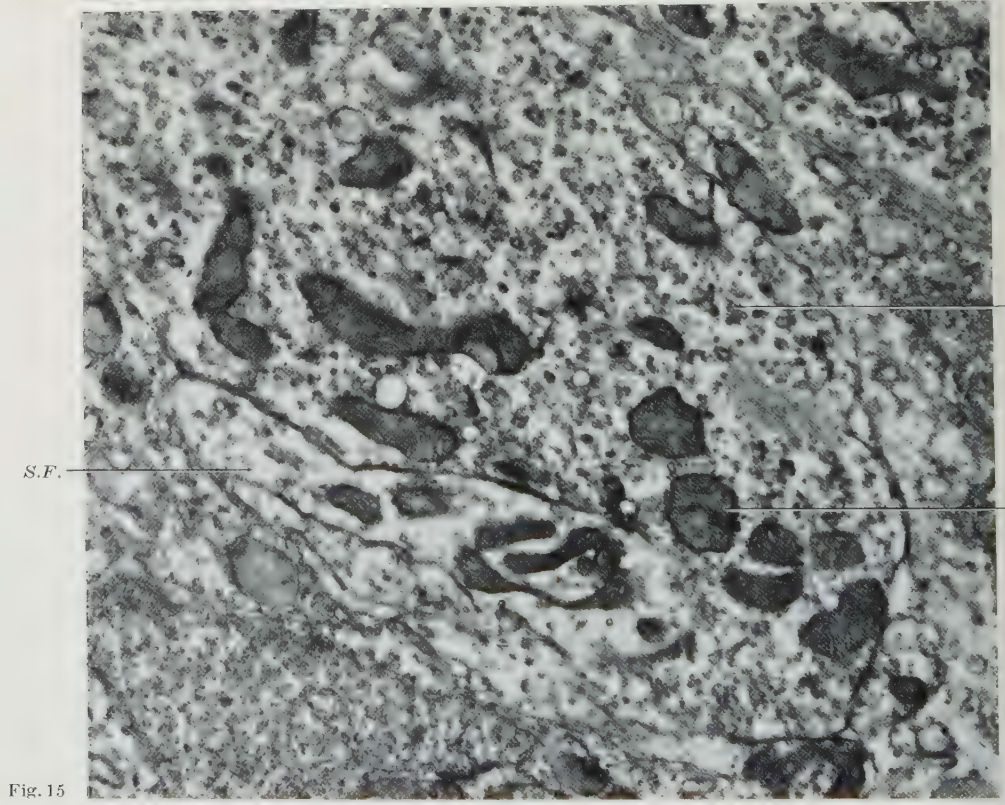


Fig. 15

Fig. 14. Oblique section through the upper portion of a supra orbitary neuromast of *Cnesterodon decemmaculatus*. The micrograph illustrates the apical region of three receptor cells bearing "sensory hairs". This picture makes evident that these hairs consist of microvilli (*M.v.*) and cilia (*C*). A dense filamentous material (*F.M.*) lies beneath the surface of the cell. (*M*) mitochondria. 22000 ×

Fig. 15. Basal region of a neuromast sensory cell. The cytoplasm at this level contains a large amount of small vesicles (*V*) intermixed with thin tubules and mitochondria (*M*). A sensory nerve fiber (*S.F.*) is seen deeply recessed in the surface of the cell. Immersed in the axoplasm are mitochondria and a few vesicles. 22000 ×

are not restricted to the terminal portion of the fibers, but are also found along their intraepithelial course.

II. Sensory cells of the ampullar crests of *Cnesterodon decemmaculatus* and *Fitzroyia lineata*. Due largely to the histological work of Retzius and Cajal,

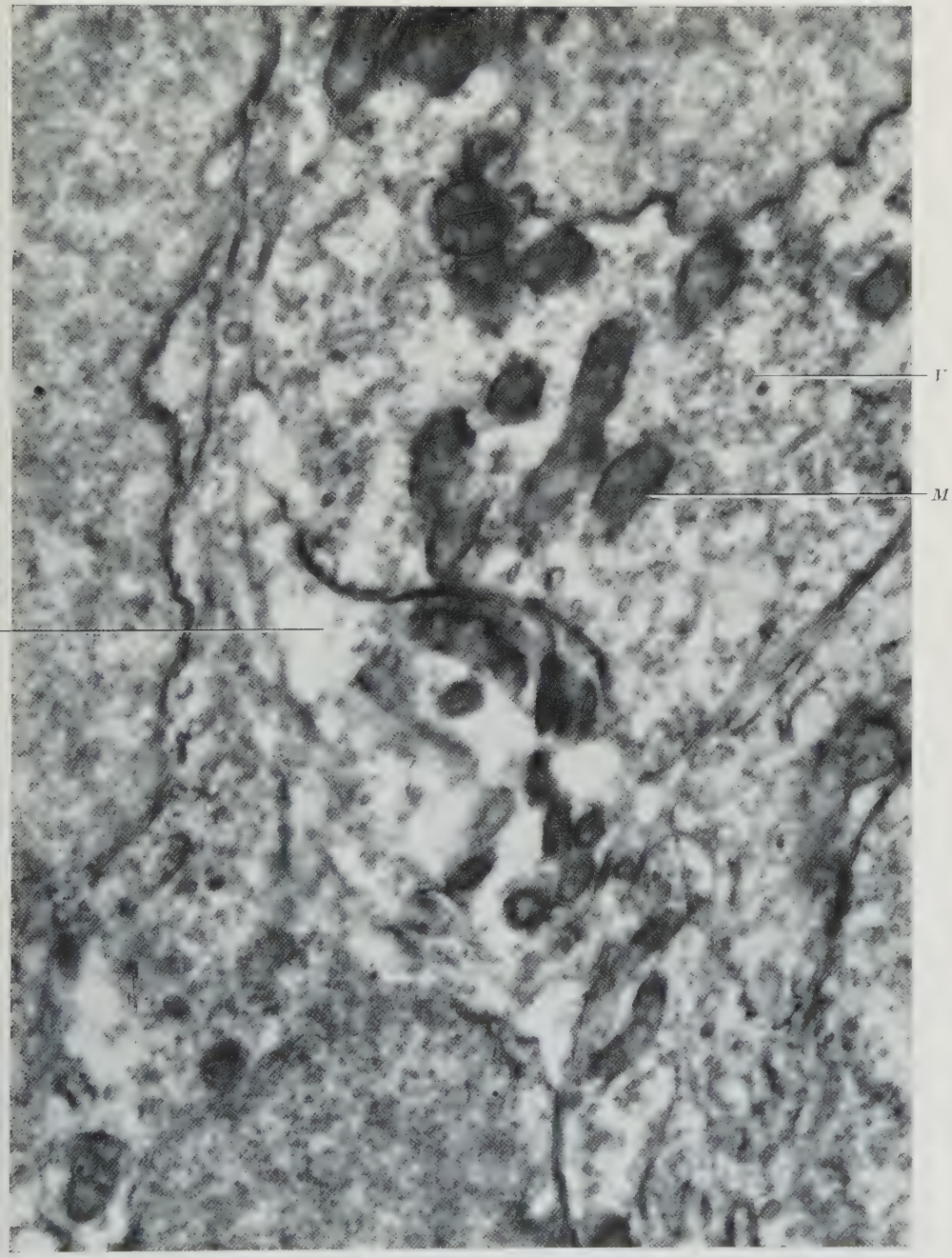


Fig. 16. Electronmicrograph showing a nerve calyx (*N.C.*) in close contact with the basal pole of a neuromast receptor cell. The cytoplasm of the cell is filled with small vesicles (*V*), while the nerve fiber contains only a few of them. (*M*) mitochondria. 30000 ×

the general arrangement of vestibular sensory elements is now a well known fact. On the other hand, electronmicroscopical studies made by Engström and Wersäll (1958) and Lowenstein and Wersäll (1959) have added important information on the fine structure of the vestibular epithelium of mammals and Elasmobranch fish. Our observations in general coincide with those made by the above mentioned authors.

The ampullar crests of *Cnesterodon* and *Fitzroyia* consist of two types of cells: the sensory cells and the sustentacular cells (Fig. 18). As in the preceding de-

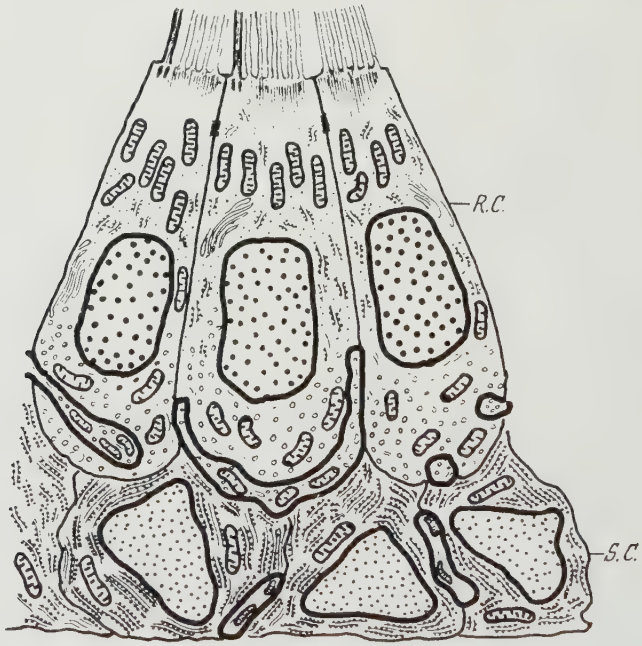


Fig. 17. Drawing illustrating the three main types of neurocpithelial functions (nerve fiber deeply recessed in the cytoplasm, calyx type and knob-like endings) found in the neuromasts of the lateral line system of *Cnesterodon decemmaculatus* and *Fitzroyia lineata*. (*R.C.*) receptor cell; (*S.C.*) sustentacular cell

scriptions, the sensory cells will be divided into three regions: the apical region, the medial region and the basal region.

1. The apical region. As can be recognized in Figs. 19 and 20 a group of well developed "sensory hairs" arise from the outer membrane of the vestibular cells. Cross sections of these "hairs" clearly show that each group consists of several microvilli and only one cilium. This was always seen asymmetrically located within the group of hairs. Beneath the cell surface it is possible to observe a dense filamentous material (cuticular plate, Fig. 21). At this level the cytoplasm contains mitochondria and clusters of minute dense granules.

2. The medial region. In this region lies the nucleus of the cell. It contains a ligth, chromatinic material and a dense nucleolus, which is frequently seen in the periphery of the nucleus. Mitochondria and vesicles are scattered together with Golgi elements in the perinuclear cytoplasm.

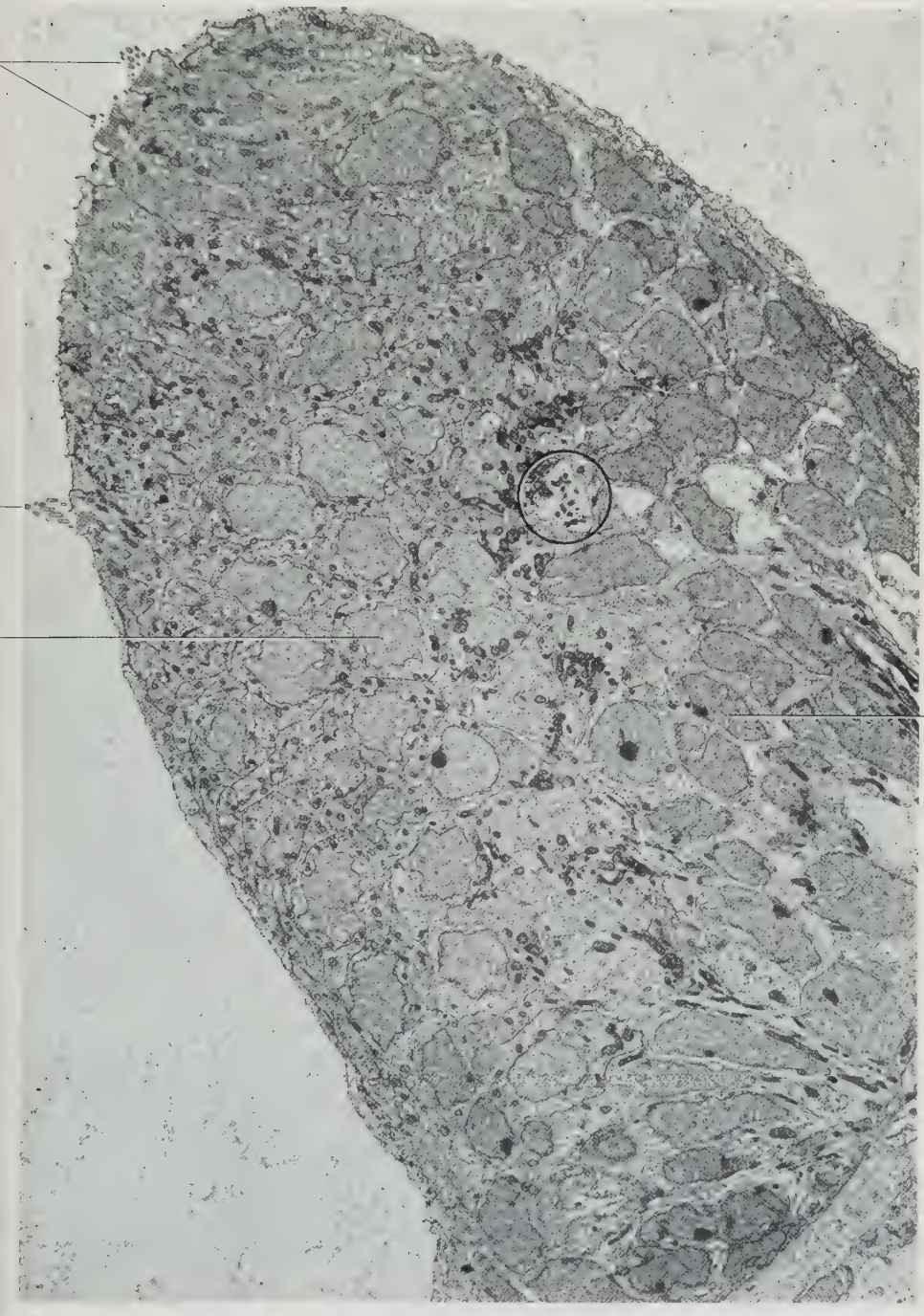


Fig. 18. A low power view of an oblique section through the crista ampullares of *Cnesterodon*. Note that most of the receptor cells were transversally cut at the level of the nuclear region. Only three groups of sensory hairs (*S.H.*) are seen arising from the apical membrane of the receptor cells. It is possible to observe a large nerve ending (encircled) containing mitochondria and small vesicles. (*R.C.*) receptor cells; (*S.C.*) sustentacular cells. 4500 ×

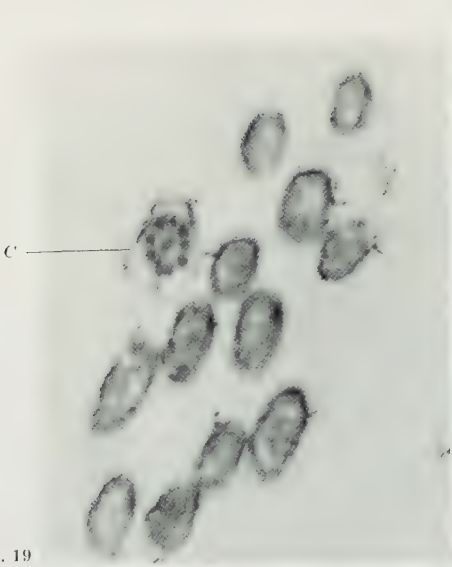


Fig. 19

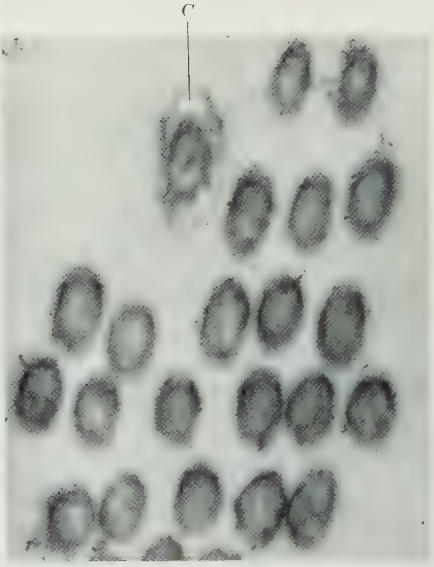


Fig. 20

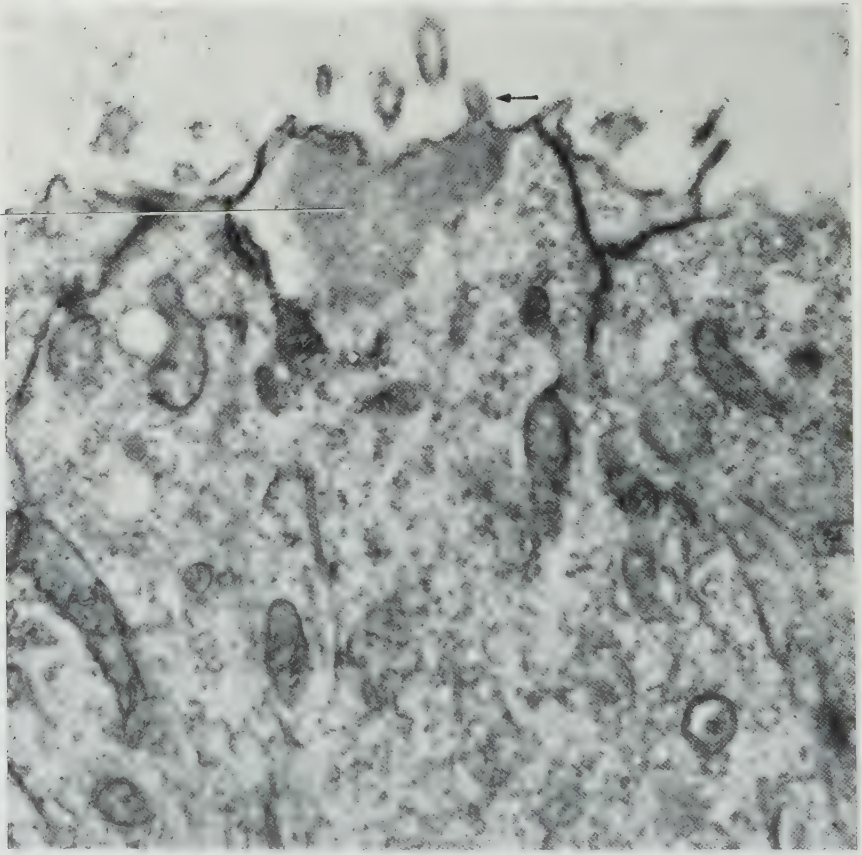


Fig. 21

Figs. 19 and 20. Cross sections of two groups of sensory hairs. These consist of several microvilli and only one cilium (*C*). 28 000 ×

Fig. 21. Micrograph showing the apical region of a vestibular sensory cell. At the point indicated by an arrow it is possible to observe a short segment of a microvilli which arises from the outer membrane of the cell. Just beneath this membrane lies a dense filamentous material (*F. M.*) which represents the cuticular plate. The cytoplasm contains mitochondria and small granules. 24 000 ×

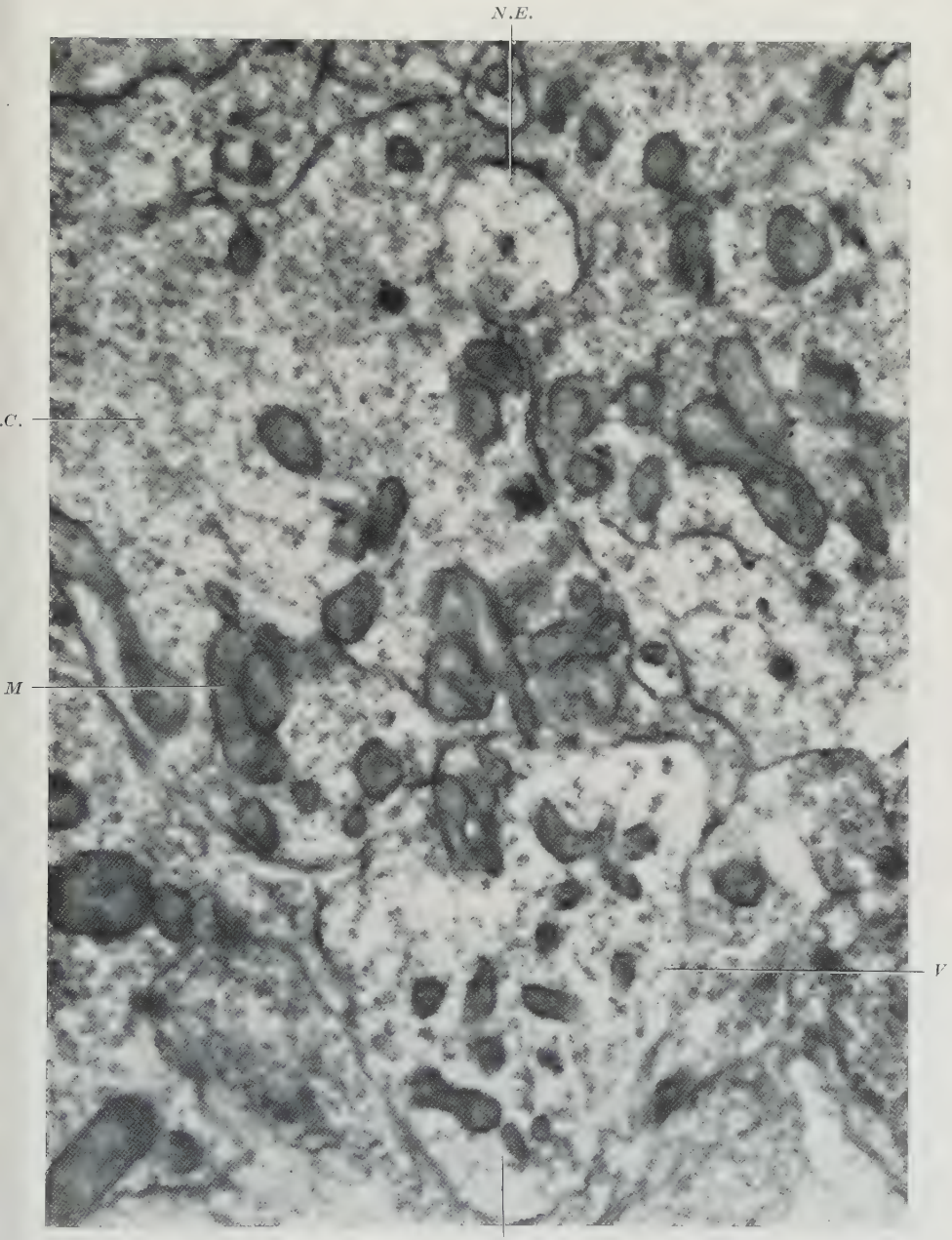


Fig. 22. Electronmicrograph showing at a higher magnification the nerve ending encircled in Fig. 18 (*R.C.*) receptor cell; (*N.E.*) nerve ending; (*V*) vesicular material; (*M*) mitochondria. 25000 ×.

3. The basal region. At this level the cytoplasm of the receptor cells is characterized by the presence of a large amount of mitochondria and vesicles which are similar to those found in the neuromasts' receptor cells. These structures are particulary abundant in the proximity of the nerve endings. Intermixed with the mitochondria there are profiles of E. R. cisternae and dense granules.

The sensorial fibers. The sensorial fibers show along the intra-epithelial course a large amount of elongated mitochondria aligned just bellow their surface.

In addition the axoplasm contains thin tubules and numerous vesicles, which are particularly abundant in the terminal swelling (Fig. 22).

It is highly probable that most of the neuroepithelial junctions studied in *Cnesterodons* and *Fitzroyia* embryos were not fully developed and therefore it is possible that some morphological changes may occur in later stages of growth. Nevertheless, the images observed suggest that they adopt a calyx type of ending.

Discussion

When considering the problem of chemo- and mechano-reception from a morphological point of view, two questions arise: the first is in connection with the fine structure and functional significance of the so-called "sensory hairs"; the second deals with the fine structure of the junction established between the epithelial receptor cells and the sensorial nerve endings.

It is well known from optical studies that most sensory cells (specially those playing an exteroceptive function) bear on their apical surface a variable number of hair-like structures. It is assumed that these "sensory hairs" record information or convey stimuli from the external medium to the cytoplasm of the receptor cell. Electronmicroscopical investigations have demonstrated that under the general name of "sensory hairs" two different structures have been included: cilia and microvilli. It is important to note that the functional significance of these structures may be different, whether they occur in a mechano-receptor or in a chemo-receptor cell.

A comparative electronmicroscopical study of different chemo-receptor organs has failed to demonstrate in the "sensory hairs" of receptor cells any common structural pattern which could be related to the chemo-receptor mechanism. This function can be accomplished by means of cells bearing cilia, bearing microvilli, or lacking both structures. Perhaps a more comprehensive view of this problem can be obtained if we consider cilia and microvilli of chemo-receptor cells as devices directed to increase effectiveness of the whole receptive system. Usually each chemo-receptor cell has only a few square microns of membrane surface in contact with the external environment and the presence of microvilli may be seen as a mechanism directed to increase the "active surface" of the receptor element. In other types of cells (i.e.: olfactory neurons) a similar function is accomplished by the presence of cilia which activate by their movements the collisions between the stimulant particles and the receptor cell membrane.

The problem of reception of stimuli seems to be more complicated in mechano-receptor cells. Recently, Lowenstein and Wersäll (1959) showed that the one cilium present in the sensory cells of vestibular crests has a constant position in connection with the gross anatomy of the organ. These authors correlate the morphological asymmetry determined by this cilium with the functional asymmetry of the vestibular system. Our observations on the neuromasts of the lateral line system (which also exhibits functional asymmetry, Sand 1956) suggest that each sensory cell—like those of the vestibular epithelium—bears only one cilium asymmetrically located within the sensory processes. It is possible that in this type of mechano-receptor cells cilia and microvilli may act as levers (of different mechanical characteristics) which convey stimuli to the receptor cell cytoplasm.

The sensory epithelial cells are connected with the central nervous system by means of nerve fibers originated in the cranial ganglia. In most cases these fibers contact with the basal pole of the sensory epithelial cells forming more or less complicated types of neuroepithelial junctions. Our observations demonstrate the existence of at least three types of neuroepithelial junctions characterized by the localization of the microvesicular material; a first type in which microvesicles are concentrated almost exclusively in the terminal swelling of the sensory fiber (organ of Corti; Smith and Dempsey 1957; gustatory bud of mammals; Trujillo-Cenóz 1957; de Lorenzo 1958; R. G. Murray, and A. Murray, 1960); a second type in which microvesicles are concentrated in both, the basal pole of the receptor cell and in the sensory fiber (neuromasts of the lateral line system and vestibular cells of fishes), and finally a third type in which microvesicles are scarce in the nerve fiber and in the receptor cells (taste buds of *Corydoras*). At present we cannot explain the functional significance of these morphological differences but it seems probable that they may be associated with differences in reactivity (continuous activity, intermittent activity, etc.) of receptor organs to physical stimuli.

Summary

This paper reports on the fine structure of chemo- and mechano-receptor cells found in three species of fishes (*Corydoras paleatus*, *Cnesterodon decemmaculatus*, *Fitzroyia lineata*).

Taste cells were studied in the food-finding barbels of adult species belonging to the Genus *Corydoras*. They are characterized by the presence of a great amount of vesicular material concentrated at the level of the apical and medial region. Most of these cells terminate at the barbel surface by means of a cylindrical or tapered extremity devoid of "sensory hairs". It was possible to observe, in some cases, the existence of short and ill defined microvilli. The basal pole of each sensory cell contacts with several sensory nerve fibers. These fibers contain mitochondria and a few vesicles.

The fine structure of the olfactory neurons was studied in full-developed embryos of *Cnesterodon* and *Fitzroyia*. The "olfactory sensory hairs" consist of long cilia which project into the lumen of the olfactory pit. Cilia arise from the "olfactory knob" which is merely an apical swelling of the dendrite. The dendrite of the olfactory neuron shows profiles of small tubules, aligned parallel to its length. Near the basement membrane of the epithelium groups of axons are seen encased in the surface of the sustentacular cells.

The mechano-receptor cells studied were: 1.) The sensory cells existing in the neuromasts of the lateral line system of *Cnesterodon* and *Fitzroyia*, and 2.) the receptor cells of the ampullar crests of the same species.

Neuromast receptor-cells have well developed "sensory hairs" which consist of cilia and microvilli. It is highly probable that each receptor cell, like those of the vestibular epithelium, bears only one cilium asymmetrically located in relation to the units of the sensory process. One of the most striking characteristics of this type of cell is the existence of a high amount of vesicular material accumulated in the cytoplasm of the basal region; it is at this level that the nerve fibers take contact with the receptor cell membrane.

Three main types of neuroepithelial junction are described in the neuromasts (nerve fiber deeply recessed in the cytoplasm, calyx type and knob-like ending).

In these junctions the vesicular material is almost exclusively concentrated in the cytoplasm of the receptor cell, while only few vesicles are seen within the neuroplasm of the sensory fibers.

The receptor cells occuring in the ampullar crests of *Cnesterodon* and *Fitzroyia* show many structural characteristics similar to those present in neuromasts' receptor cells. Like these, they bear "sensory hairs" consisting of several microvilli and only one cilium which is always asymmetrically located within the group of hairs. The basal region of the cell is filled with a large amount of small vesicles. Nerve endings also show vesicles but they are less in number than inside the cytoplasm of the receptor cell.

Comments are made on the apparent significance of the sensory hairs. These structures are considered (in chemo-receptor cells) as devices serving to enlarge the "active surface" of the cell and increasing by this way the effectiveness of the whole receptive system. In mechano-receptor cells cilia and microvilli may act as levers of different mechanical characteristics which convey stimuli to the receptor-cell cytoplasm.

In this paper three main types of neuroepithelial junctions connecting receptor cells with the central nervous system are described.

References

Bloom, G.: Studies on the olfactory epithelium of the frog and the toad with the aid of light and electron microscopy. Z. Zellforsch. **41**, 89—100 (1954).

Engström, H., and C. Rytzner: The structure of taste buds. Acta otolaryng. (Stockh.) **46**, 364—367 (1956).

—, and J. Wersäll: The ultrastructural organization of the organ of Corti and of the vestibular sensory epithelia. Exp. Cell Res. Suppl. **5**, 460—492 (1958).

Gasser, H. S.: Olfactory nerve fiber. J. gen. Physiol. **39**, 473—496 (1956).

Iurato, S.: Structure submicroscopique des cellules ciliées de l'organe de Corti. J. franc. Oto-rinolaryng. **9**, 67—75 (1960).

Lorenzo, A. J. de: Electron microscopical observation of the olfactory mucosa and olfactory nerve. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 839—848 (1957).

— Electron microscopic observation on the taste buds of the rabbit. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 143—148 (1958).

Lowenstein, O., and J. Wersäll: A functional interpretation of the electron microscopic structure of the sensory hairs in the cristae of the Elasmobranch Raja clavata in terms of directional sensitivity. Nature (Lond.) **184**, 1807 (1959).

Murray, R. G., and A. Murray: The fine structure of the taste buds of Rhesus and Cynomolgus monkeys. Anat. Rec. **138**, 211—218 (1960).

Palay, S., and G. E. Palade: The fine structure of neurons. J. biophys. biochem. Cytol. **1**, 69—88 (1955).

Sand, A.: The mechanism of the lateral sense organs of fishes. Proc. roy. Soc. **123**, 472—495 (1937). Cit. by Granit, Receptors and sensory perception. New Haven: Yale University Press 1956.

Schultz, R., E. A. Maynard and D. C. Pease: Electron microscopy of neurons and neuroglia of cerebral cortex and corpus callosum. Amer. J. Anat. **58**, 421—472 (1957).

Smith, C. A., and E. Dempsey: Electron microscopy of the organ of Corti. Amer. J. Anat. **100**, 337—355 (1957).

Sotelo, J. R., and O. Trujillo-Cenóz: Electron microscope study on the development of ciliary components of the neural epithelium of the chick embryo. Z. Zellforsch. **49**, 1—12 (1958).

Trujillo-Cenóz, O.: Estructura de los neuromastos de Cnesterodon decemmaculatus. (Estudio con el microscopio electronico). An. Fac. Med. Montevideo **44**, 469—475 (1959).

— Electron microscope study of the rabbit gustatory bud. Z. Zellforsch. **46**, 272—280 (1957).

Dr. O. Trujillo-Cenóz, Departamento de Ultraestructura Celular,
Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas, Avenida Italia 3318, Montevideo, Uruguay

Zeitschrift für Zellforschung 54, 677—688 (1961)

Aus der Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin
(Leiter: Prof. Dr. med. W. Schwarz)

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE BILDUNG DER *ZONA PELLUCIDA* IN DEN FOLLIKELN DES KANINCHENOVARS

Von

H.-J. Merker*

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. März 1961)

Die Bildung der *Zona pellucida* des Säugetiereies ist lichtmikroskopisch schon oft untersucht worden. Dabei konnte jedoch nicht geklärt werden, ob die Follikelzellen oder die Eizelle das Material zur Bildung dieser Membran zur Verfügung stellen. Van Beneden (1880), O'Donoghue (1912), Hartmann (1926), Mainland (1928) und Fischer (1935) nahmen an, daß das Ei die *Zona pellucida* bildet. Dagegen verlegten Paladino (1890), Flemming (1897), Waldeyer (1906), Regaud und Dubreiul (1908), Retzius (1912), van der Stricht (1923), Strassmann (1933) und Kingsbury (1939) die Bildung in die Follikelzellen (s. Lit. H. S. Chaudry 1956). Elektronenmikroskopische Untersuchungen dieses Vorganges liegen bereits von mehreren Autoren vor, jedoch konnte auch jetzt keine Einigung über den Bildungsort der *Zona pellucida* erzielt werden. Trujillo-Cenoz et al. (1959) und Chiquoine (1960) diskutierten die Synthese der *Zona pellucida* in den Follikelzellen, Franchi (1960) macht dagegen die Eizellen dafür verantwortlich. Wartenberg et al. (1960) und Stegner et al. (1961) halten eine Entstehung der *Zona pellucida* in den Follikelzellen und in der Eizelle für möglich. Diese Autoren beschreiben hauptsächlich die Veränderungen an den Zellmembranen des Eies, der Follikelzellen und die Feinstruktur der *Zona pellucida*. Die Organellen in den Zellen, die für eine Synthese des *Zona pellucida*-Materials in Frage kommen, wurden jedoch dabei noch nicht berücksichtigt.

Die *Zona pellucida* soll Eiweiße und Mukopolysaccharide, besonders Hyaluronsäure enthalten (Watzka 1957). Die Eiweiße werden nach Palade (1956), Siekevitz (1959) u. a. an den RNS-Granula des endoplasmatischen Retikulums gebildet. Eiweißsezernierende Zellen zeichnen sich deshalb durch den Reichtum an Membranen des endoplasmatischen Retikulums mit einem Besatz von RNS-Granula aus. Der Ort der Mukopolysaccharidsynthese in den Zellen ist noch nicht sicher bekannt. Untersuchungen von Knese et al. (1960) Merker et al. (1960), Schwarz (1960), Sheldon (1960) Merker (1961) lassen jedoch vermuten, daß das endoplasmatische Retikulum eine wichtige Rolle bei der Mukopolysaccharidbildung spielt. Die Zellen, die das Material zum Aufbau der *Zona pellucida* bilden, müßten also reichlich Strukturen des endoplasmatischen Retikulums enthalten. In dieser Arbeit soll deshalb das endoplasmatische Retikulum der Eizelle und der Follikelzellen elektronenmikroskopisch untersucht werden. Dabei werden die Veränderungen an den Membranen der Eizelle und der Follikelzellen und auch die Morphologie der *Zona pellucida* berücksichtigt.

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Material und Methoden

Aus den Ovarien junger Kaninchen wurden kleine Gewebsstücke entnommen und in einer 1%igen OsO_4-Lösung (p_H 7,4) nach Palade fixiert. Die Tiere hatten teilweise vorher eine einmalige Injektion von „Primogonyl“[1] erhalten. Die Mengeneinheit der Injektion wurde nach dem Gewicht der Kaninchen berechnet.

Einbettung: Methacrylat-Gemisch 30:70. Zum Schneiden verwendeten wir Sjöstrand- und Porter-Blum-Mikrotome. Ein Teil der Schnitte wurde in einer 1%igen wäßrigen Uranylacetat- oder Phosphorwolframsäurelösung nachkontrastiert und anschließend mit Kohle senkrecht bedampft (Watson 1958).

Aufnahmen: Zeiss-Elektronenmikroskop Typ EM 8/II bei einer Strahlenspannung von 40—50 kV.

Befunde

In den Ovarien junger Kaninchen lassen sich die Primär- und Sekundärfollikel elektronenmikroskopisch gut darstellen. Die Zahl der Sekundärfollikel nimmt nach einer Injektion von Primogonyl zu. Die Eizellen in den Primärfollikeln sind von einer einfachen Lage flacher Follikelzellen kontinuierlich umgeben (Abb. 1). In dieser vollständigen Follikelzellhülle konnten wir niemals Lücken nachweisen. Die Ränder der Follikelzellen legen sich so dicht aneinander, daß zwischen zwei sich berührenden Zellmembranen nur ein Zwischenraum von 100 bzw. 120 Å bleibt. Teilweise überlappen sich die Follikelzellränder an ihren Berührungspunkten. Nach außen wird jeder Follikel von einer 150 Å breiten Basalmembran begrenzt, die in etwa 100—120 Å Abstand parallel der basalen Follikelzellmembran verläuft (Abb. 2). Die Sekundärfollikel haben ebenfalls eine Basalmembran. Der Kern der Follikelzellen im *ruhenden Primärfollikel* ist flach und manchmal etwas eingekerbt. Das Cytoplasma enthält nur wenige Mitochondrien und Membranstrukturen. Ein typischer Golgi-Apparat ist jedoch fast immer zu beobachten. Die eiwärts gelegene Zellmembran der Follikelzellen grenzt an die Eizellmembran. Der helle Raum zwischen beiden Membranen ist gleichmäßig 120 Å breit. Das Zytoplasma der Eizelle enthält dicht unter der Zellmembran kleine Vesikel mit einem Durchmesser von etwa 300—1000 Å, die von einer glatten Membran begrenzt sind. *Membranstrukturen* des endoplasmatischen Retikulums sind nur selten *in Form kleiner, flacher* oder *verzweigter Hohlräume* zu beobachten, die nur teilweise einen Besatz von Palade-Granula haben. Auf die Beschreibung der restlichen Zellorganellen soll hier verzichtet werden.

Beginnt ein ruhender Follikel zu wachsen, so verändert sich die Feinstruktur der Follikelzellen und der Eizelle in charakteristischer Weise. Der flache Zelleib der Follikelzellen wird kubisch und der Zellkern rundet sich ab. Membranen des endoplasmatischen Retikulums mit einem Besatz von RNS-Granula treten vermehrt auf, ebenso nimmt die Zahl der Mitochondrien zu. Die Zellmembran hebt sich an einigen Stellen von der Eizellmembran ab (Abb. 3). In dem dabei entstehenden Raum kann jetzt schon ein zartes wolkiges Material nachgewiesen werden. Die zur Eizelle gerichtete Membran der Follikelzellen bildet Fortsätze aus, die sich baumartig verzweigen und an einigen Stellen an der Eizellmembran haftenbleiben. Die Membran der Eizelle hat sich ebenfalls stark verändert. Die Eizelloberfläche besteht jetzt aus einem dichten Besatz von Mikrovilli. Während dieser Veränderung der Zellmembranen verdichtet sich die beschriebene wolkige Substanz zwischen Ei- und Follikelzellen zu deutlich sichtbaren Plaques (Abb. 4). Diese Plaques vergrößern sich durch Anlagerung von neuem Material und fließen

[1] Für die Überlassung des Primogonyls danken wir der Schering AG, Berlin.

allmählich zu einer kontinuierlichen Hülle um die Eizelle zusammen, zur *Zona pellucida* (Abb. 5). Diese Membran mauert dabei die runden Fortsätze der Follikel-

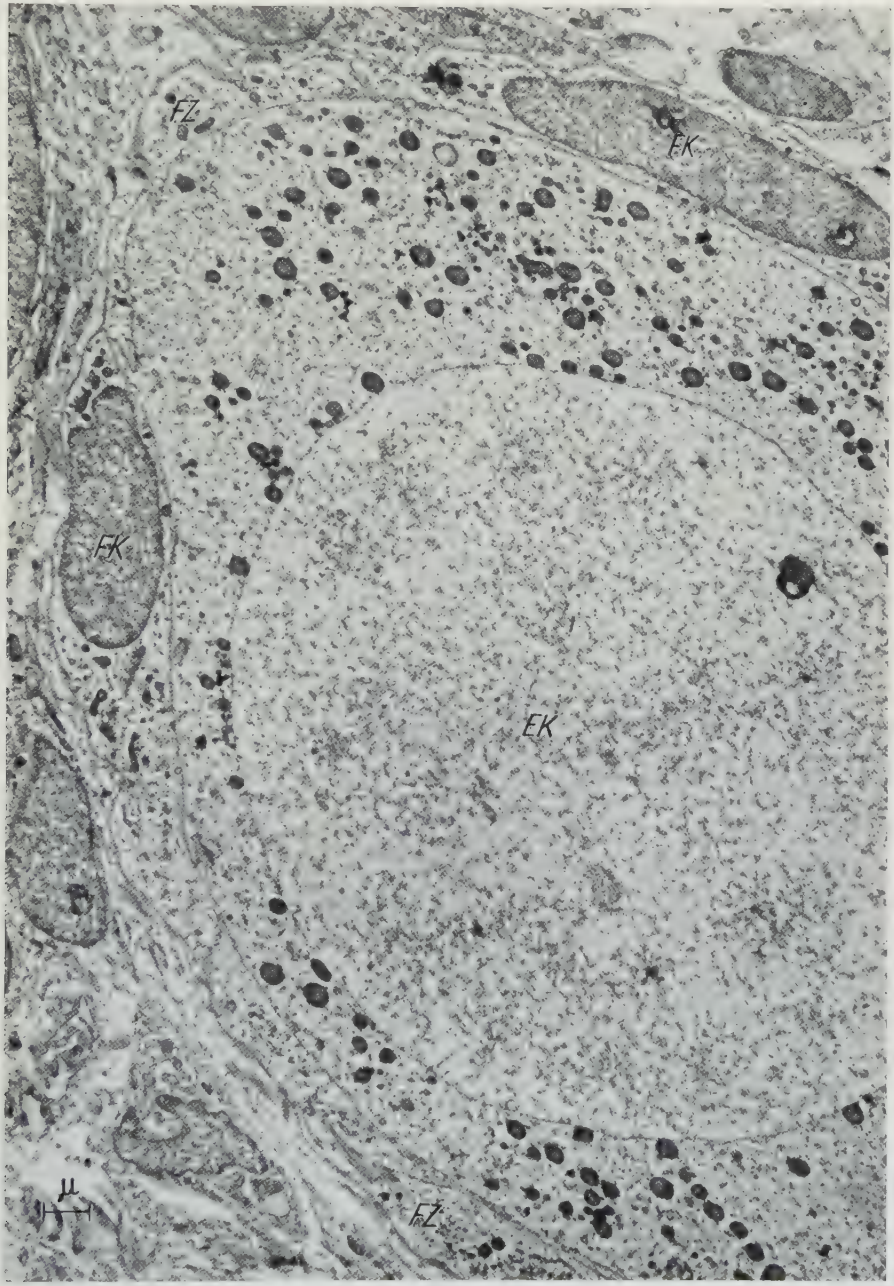


Abb. 1. Primärfollikel aus dem Ovar eines jungen Kaninchens. *EK* Eizellkern; *FK* Follikelzellkern; *FZ* Follikelzellfortsätze. 1:6500

zellen und die Mikrovilli des Eies ein. An der Eioberfläche verdichtet sich die *Zona pellucida* immer mehr, so daß sie hier fast homogen erscheint. Zu den

Follikelzellen hin ist sie weniger dicht und behält ihr wolkiges Aussehen. Hier werden neue Plaques aus den Räumen zwischen den Follikelzellen angelagert.

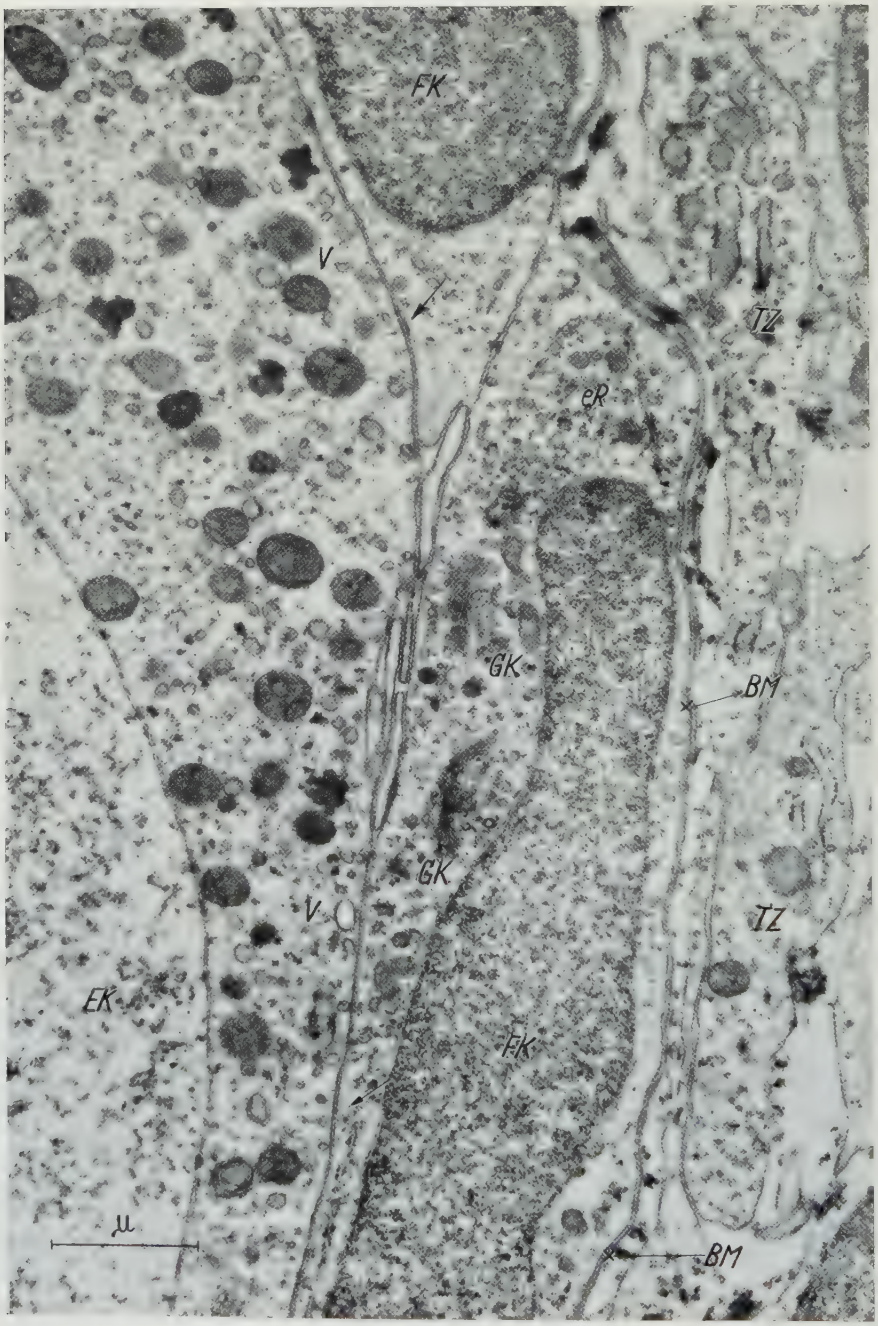


Abb. 2. Eizelle mit niedrigem Follikelepithel. Paralleler Verlauf der Eizell- und Follikelzellmembran (Pfeil). *V* vesiculäre Strukturen, *eR* endoplastisches Retikulum, *GK* Golgi-Komplex; *BM* Basalmembran; *TZ* Thekazellen. 1:20000

Die Zahl der Follikelzellen hat sich inzwischen stark vermehrt. Sie bilden jetzt ein mehrschichtiges Epithel mit großen Lücken zwischen den Zellen, die dadurch

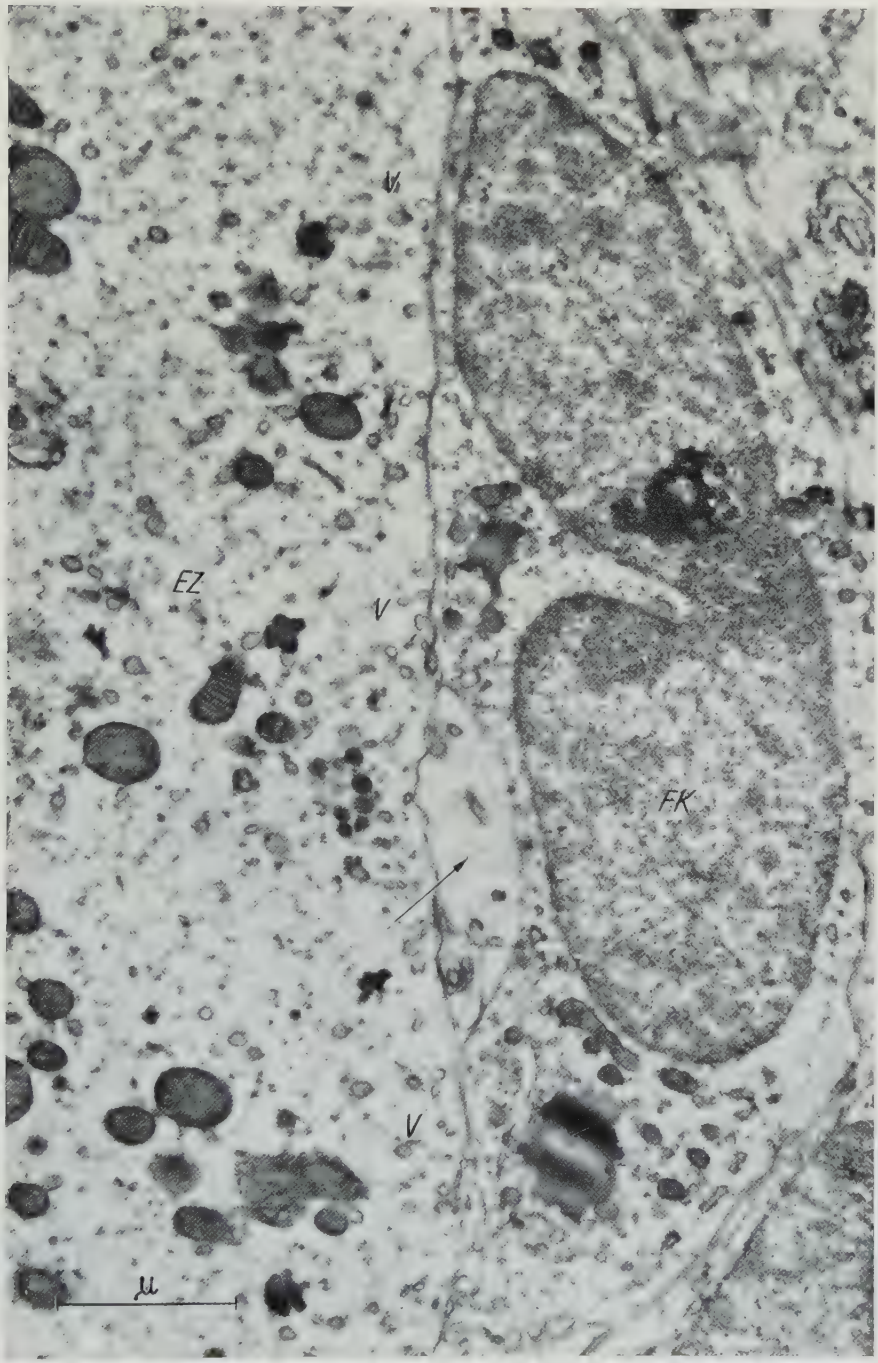


Abb. 3. Eizelle mit niedrigem Follikelepithel. Entstehung von interzellulären Räumen zwischen Eizelle und Follikelzelle mit einem wolkigen Inhalt (Pfeil). 1:24000

eine stark verzweigte Form haben und sich nur noch mit unregelmäßig gestalteten Fortsätzen berühren. Manche Zellen sind ringförmig um Hohlräume mit nur

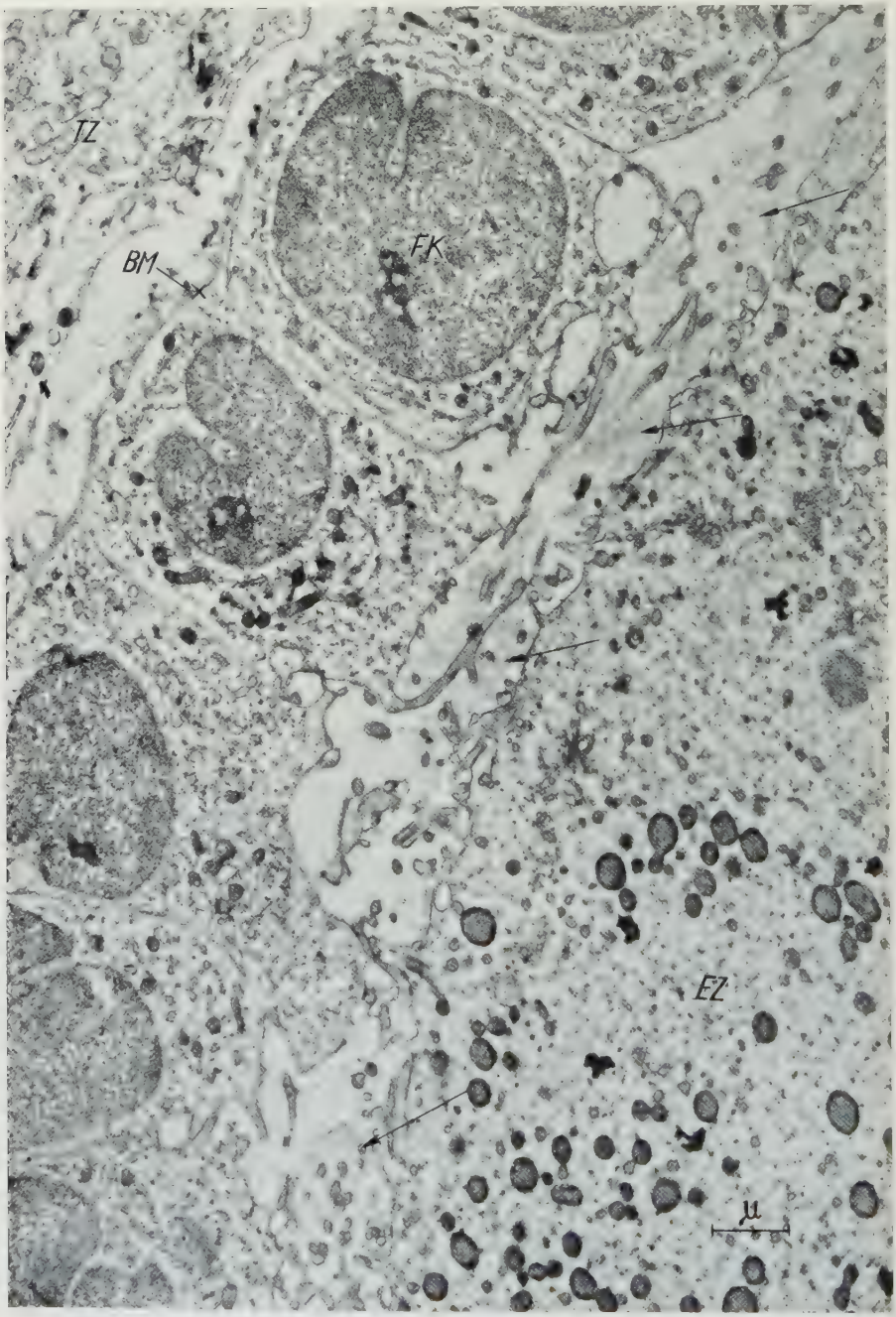


Abb. 4. Eizelle mit kubischem Follikelepithel. Ausbildung von Mikrovilli an der Eizelloberfläche und langen Fortsätzen der Follikelzellen. Anhäufung eines feingranulären Materials zwischen Eizelle und Follikelzellen (Pfeil). 1:10000

wenig granulärem Inhalt angeordnet. Die Zellen werden von den Hohlräumen durch eine basalmembranartige Schicht getrennt (Abb. 6). Wir halten diese

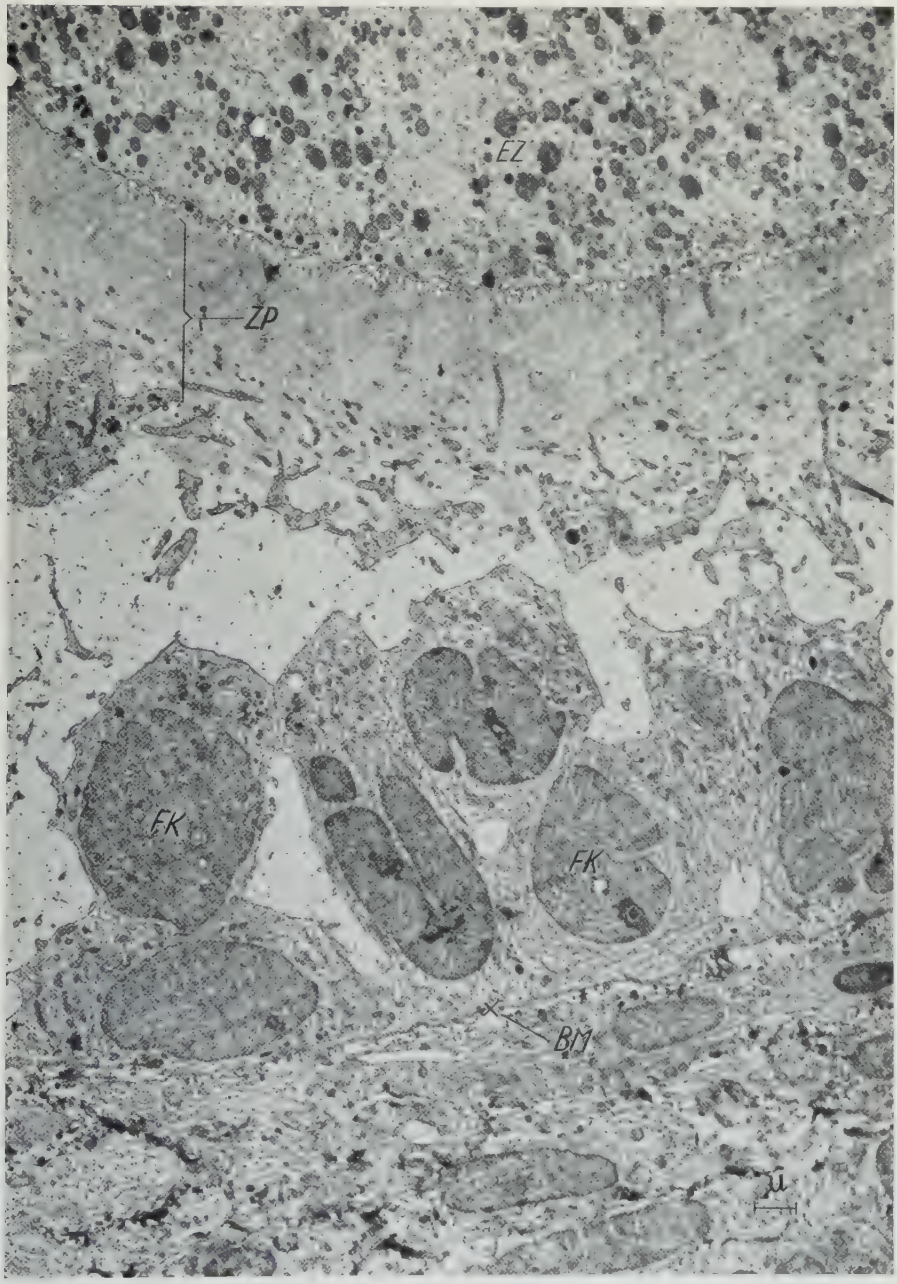


Abb. 5. Eizelle mit mehrschichtigem Follikelepithel. Verdichtung der Zona pellucida (*ZP*) an der Eizelloberfläche. 1:4500

Zellhaufen in den Follikeln für die sog. Call-Exnerschen Körperchen. Nur die äußere Zellschicht liegt der Basalmembran lückenlos auf. Im Zytoplasma der

Follikelzellen liegen reichlich Membranstrukturen des endoplasmatischen Retikulums mit einem RNS-Granulabesatz, die flache oder verzweigte Hohlräume einfassen (Abb. 6). Der Durchmesser der Eizelle hat sich während der Bildung des

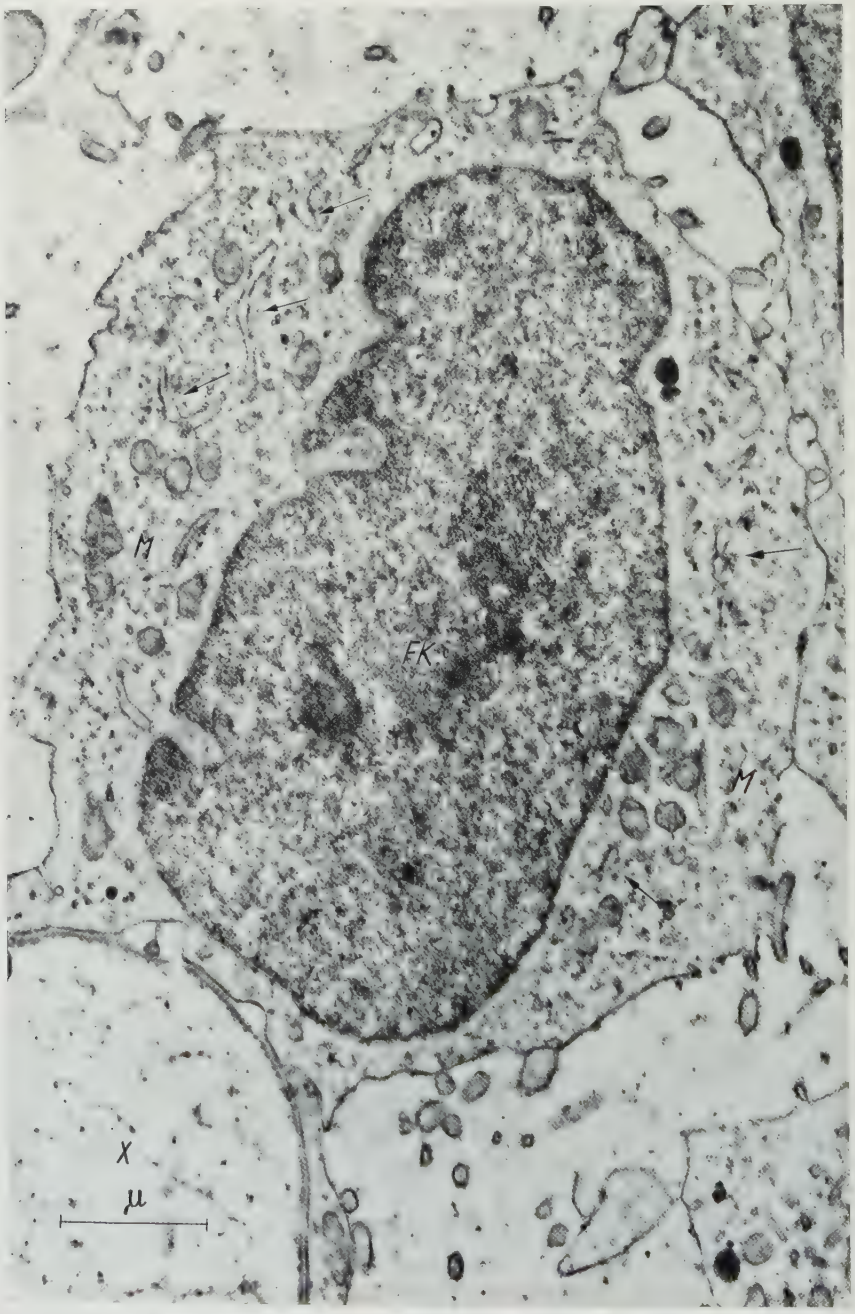


Abb. 6. Follikelzelle aus einem Follikel mit mehrschichtigem Epithel. Strukturen des endoplasmatischen Retikulums (Pfeile) und Mitochondrien (*M*). Bei *x* ein membranbegrenzter Raum zwischen den Follikelzellen. 1:20000

Sekundärfollikels stark vergrößert. Die Zahl der Vesiculae dicht unter der Eizellmembran hat zugenommen. Strukturen des endoplasmatischen Retikulums mit oder ohne Granulabesatz sind auch jetzt nur selten zu beobachten. Auffällig ist die Wanderung kleiner Golgi-Komplexe in die Peripherie der Eizelle und die große Zahl der Dottergranula.

Diskussion

Die Bildung der *Zona pellucida* beginnt nach unseren elektronenmikroskopischen Befunden in einem sehr frühen Stadium der zweiten Wachstumsperiode des Eies. Lichtmikroskopisch konnte sie oft erst in Follikeln mit zwei- oder mehrschichtigem Epithel nachgewiesen werden (Deane 1952, Watzka 1957). Van Beneden allerdings beobachtete bereits 1880 bei der Fledermaus eine *Zona pellucida* in Follikeln mit einschichtigem Epithel. Bargmann (1959) beschreibt ebenfalls die Entstehung des Oolemm bei hohem, einschichtigem Epithel.

Elektronenmikroskopisch läßt sich zeigen, daß ein interzelluläres Material schon sichtbar wird, wenn sich die Membranen der Follikelzellen an einigen Stellen von der Eizellmembran abheben (Yamada et al. 1957, Odor 1960). Versucht man die elektronenmikroskopischen Bilder in eine chronologische Reihe einzuordnen, so gewinnt man den Eindruck, daß die *Zona pellucida* durch Anlagerung von außen her wächst. Das feingranuläre und filamentöse Material zwischen den Follikelfortsätzen und der Eizellmembran fließt zu einer kontinuierlichen Schicht um die Eizelle zusammen. Zwischen den Follikelzellen lassen sich in späteren Stadien noch weitere Substanzen nachweisen, die an die *Zona pellucida* angelagert werden und sie verdicken. Das Material zwischen den Follikelzellen kann entweder von außen in den Follikel einströmen oder von den Follikelzellen selbst gebildet werden. Der Übertritt verschiedener Stoffe aus dem Blut in den Follikel konnte von einigen Autoren nachgewiesen werden (Watzka 1957, J. Brachet 1960). Burr und Davis (1951) halten sogar die Follikelflüssigkeit für ein Transsudat aus der Blutbahn. Die hohe Konzentration der Eiweiße und Mukopolysaccharide um die Eizelle herum kann jedoch damit allein nicht erklärt werden. Es muß also eine Syntheseleistung der Follikelzellen angenommen werden. Autoradiographische Untersuchungen von Odeblad et al. (1953) und Mancini (1960) bestätigen diese Auffassung. Nach Gaben von markiertem Sulphat sahen sie zuerst eine Anreicherung des Schwefels in den Follikelzellen. Der Schwefelgehalt nimmt dann in den Zellen ab und steigt dabei in der Follikelflüssigkeit an. Die Autoren schließen auch aus anderen histochemischen Befunden, daß die Follikelzellen Mukopolysaccharide produzieren und an die Follikelflüssigkeit abgeben. Brachet et al. (1956) und Müller et al. (1960) kamen mit markierten Aminosäuren zu ähnlichen Ergebnissen. Diese Vorstellung kann durch elektronenmikroskopische Bilder gestützt werden. Die Synthese der Eiweiße ist nach Palade (1956), Siekevitz (1958) u. a. an die Strukturen des endoplasmatischen Retikulums gebunden, wahrscheinlich auch die Synthese der Mukopolysaccharide (Knese et al. 1960, Schwarz 1960, Sheldon 1960, Merker 1961). Die Follikelzellen besitzen ein gut ausgebildetes endoplasmatisches Retikulum. Die Synthese dieser Stoffe ist hier also durchaus denkbar. Die Eizelle dagegen enthält nur wenige Membransysteme des endoplasmatischen Retikulums. Aus diesen Gründen möchten wir die Synthese der Baustoffe der *Zona pellucida* in die Follikelzellen

verlegen. Stegner et al. (1961) und Wartenberg et al. (1960) stellen histochemisch in menschlichen Follikelzellen ebenfalls saure Mukopolysaccharide dar. Elektronenmikroskopisch lokalisieren sie diese Stoffe in bizarr geformte, stark osmiophile Einschlüsse. Bislang konnte jedoch eine derartige Anfärbung der sauren Mukopolysaccharide nach Osmiumfixierung nicht nachgewiesen werden. In Fibroblasten, Chondroblasten und Osteoblasten dagegen werden die histochemisch faßbaren Mukopolysaccharideinschlüsse in die erweiterten Abschnitte des endoplasmatischen Retikulums verlegt (S. Fitton Jackson 1957, Sheldon 1960, Knese et al. 1961, Merker 1961, Schwarz 1961. Darüber hinaus beschreiben Stegner et al. (1961) in menschlichen Eizellen Vakuolen, die mit einem Material gefüllt sind, das die gleiche Dichte wie die *Zona pellucida* hat.

Sie schließen daraus, daß die Eizelle die *Zona pellucida* bildet. Die Vakuolen sollen zur Eioberfläche wandern und dort ihren Inhalt abgeben. Dieser Vorgang kann jedoch auch umgekehrt verlaufen. Viele Autoren, die Eizellen elektronenmikroskopisch untersucht haben, erwähnen die große Zahl der pinozytotischen Vesikel in der Eizellperipherie (Press 1959, Sotelo et al. 1959, Anderson et al. 1960, Chiquoine 1960, Odor 1960). Press (1959) diskutiert auch die Aufnahme ganzer Follikelzellfortsätze. Bei den Insekten werden sogar ganze Follikelzellen in der Eizelle aufgenommen und dort verdaut (Schrader und Leuchtenberger 1952). Auch wir deuten die kleinen Bläschen in der Peripherie der Eizelle als Ausdruck einer pinozytotischen Aktivität. Die Vakuolen in der Eizelle, die Stoffe der *Zona pellucida* enthalten, können also auch umgekehrt Stoffe in die Zelle hineintransportieren. Niendorf (1951) hat die Rolle von Abbauprodukten der *Zona pellucida* für die Ernährung der Eizelle unterstrichen. Nach Watzka (1957) haben die Eizellen ebenso wie die Spermatozyten die Fähigkeit verloren, sich selbst zu ernähren. Sie brauchen dafür Hilfszellen, die ihnen entsprechende Stoffe vorbereiten und anbieten.

Die Eizelle verhält sich jedoch bei der Bildung der *Zona pellucida* nicht nur passiv. Die Ausfällung und Verdichtung der *Zona pellucida* an der Eizellmembran kann dafür sprechen, daß hier niederpolymere Stoffe zur Ausfällung oder Polymerisation gebracht werden (Chiquoine 1960). Über die Art der hierbei wirksamen Kräfte lassen sich morphologisch keine Aussagen machen. Vielleicht spielen Ladungsunterschiede an der Eizellmembran oder Milieuveränderungen durch Stoffwechselprodukte eine Rolle.

Zusammenfassung

Die Bildung der *Zona pellucida* der Eizelle wurde an den Follikeln junger Kaninchen untersucht. Die ersten interzellulären Substanzen werden sichtbar, wenn sich die Zellmembranen der Follikelzellen streckenweise von der Eizellmembran abheben. Zwischen den Follikelzellen entsteht dann neues Material, das eine vollständige Membran um die Eizelle bildet und sie durch Anlagerung von der Seite der Follikelzellen her weiter verdickt. Die *Zona pellucida* enthält Eiweiße und Mukopolysaccharide. Für die Bildung beider Substanzen muß das endoplasmatische Retikulum verantwortlich gemacht werden. In der Eizelle ist dieses Zellorganell nur gering entwickelt, in den Follikelzellen des wachsenden Follikels dagegen stark ausgebildet. Es wird daraus geschlossen, daß die Synthese der Baustoffe der *Zona pellucida* in den Follikelzellen vor sich geht. Dafür sprechen

auch autoradiographische Untersuchungen. Vesikuläre Strukturen in der Eizellperipherie, die mit elektronendichtem Material gefüllt sind, werden nicht als Ausdruck einer Syntheseleistung der Eizelle, sondern als Ausdruck einer Stoffaufnahme gewertet. Die Eizellmembran spielt möglicherweise bei der Ausfällung und Polymerisation der Eiweiße und Mukopolysaccharide an ihrer Außenfläche eine Rolle.

Literatur

Anderson, E., and H. W. Beams: Cytological observations on the fine structure of the guinea pig ovary with special reference to the oogonium, primary oocyte and associated follicle cells. J. Ultrastruct. Res. **3**, 432—446 (1960).

Bargmann, W.: In: Histologie und Mikroskopische Anatomie des Menschen, 3. Aufl. S. 590. Stuttgart: Georg Thieme 1959.

Beneden, E. van: Contribution à la connaissance dè l'ovaire des mammiferes. Arch. Biol. (Liège) **1**, 475—544 (1880).

Brachet, J.: The biochemistry of development. London-Oxford-New York-Paris: Pergamon Press 1960.

Burr, J. H., and J. I. Davis: The vascular system of the rabbit ovary and its relationship to ovulation. Anat. Rec. **111**, 273—297 (1951).

Chaudry, H. S.: The origin and the structure of the zona pellucida in ovarian eggs of teleosts. Z. Zellforsch. **43**, 478—485 (1956).

Chiquoine, A. D.: The development of the zona pellucida of the mammalian ovum. Amer. J. Anat. **106**, 149—170 (1960).

Deane, H. W.: Histochemical observations on the ovary and oviduct of the albino rat during the estrous cycle. Amer. J. Anat. **91**, 363—413 (1952).

Fischer, A.: Zur Kenntnis der Struktur des Oolemmas der Säugetierzelle. Anat. Hefte **89**, 329—338 (1935).

Fitton Jackson, S.: The fine structure of developing bone in the embryonic fowl. Proc roy. Soc. B **146**, 270—280 (1957).

Flemming, W.: Über die Bildung von Richtungsfiguren in Säugetiereiern beim Untergang Graafscher Follikel. Arch. f. Anat. **51**, 43 (1897).

Franchi, L. L.: Electron microscopy of oocyte-follicle cell relationship in the rat ovary. J. biophys. biochem. Cytol. **7**, 397—398 (1960).

Hartmann, C. G.: Polynuclear ova and polyovular follicles in the opossum and other mammals, with special reference to the problem of fecundity. Amer. J. Anat. **37**, 1—51 (1926).

Kingsbury, B. F.: Atresia and the interstitial cells of the ovary. Amer. J. Anat. **65**, 309—331 (1939).

Knese, K. H., u. A. M. Knoop: Elektronenmikroskopische Befunde über die Mukopolysaccharidbildung. 9. Tagg der Dtsch. Ges. für Elektronenmikroskopie, Freiburg 1959.

Mainland, D.: The pluriovular follicle, with reference to its occurence in the ferret. J. Anat. (Lond.) **62**, 139—158 (1928).

Mancini, A. S.: Persönliche Mitteilung 1960.

Merker, H.-J., H. Greiling u. Th. Günther: Über das Vorkommen und die Bildung von Hyaluronsäure in Ascites-Tumorzellen. Z. Krebsforsch. **63**, 490—496 (1960).

— Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Fibrillogenese in der Haut menschlicher Embryonen. Z. Zellforsch. **53**, 411—430 (1961).

Müller, H. G., u. A. Linnartz-Niklas: Autoradiographische Untersuchungen über die Größe der Eiweiß-Synthese der weiblichen Genitalorgane im Metoestrus bei Ratte und Maus. Durchgeführt mit H^3-, Z^{35}- und C^{14}-markierten Aminosäuren. Arch. Gynäk. **194**, 48—62 (1960).

Niendorf, G.: Fermente und Sterilität. Arch. Gynäk. **180**, 234—236 (1951).

Odeblad, E., and H. Boström: A time-picture relation study with autoradiography on the uptake of labelled sulphate in the graafian follicles in the rabbit. Acta radiol. (Stockh.) **39**, 137—140 (1953).

O'Donoghue, C. H.: The corpus luteum in the non-pregnant Dasyurus and polyovular follicles in Dasyurus. Anat. Anz. **41**, 353—368 (1912).

Odor, D. L.: Electron microscopic studies on ovarian oocytes and fertilized tubal ova in the rat. J. biophys. biochem. Cytol. **7**, 567—574 (1960).

Palade, G. E.: The endoplasmic reticulum. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, Suppl., 85—98 (1956).

Paladino, G.: I ponti intercellulari fra l'uovo ovarico e le cellule follicolari, et la formazione della zona pellucida. Anat. Anz. **5**, 254—259 (1890).

Press, N.: An electron microscope study of a mechanism for the delivery of follicular cytoplasm to an avian egg. Exp. Cell. Res. **18**, 194—196 (1959).

Regaud, C., et G. Dubreuil: Sur les productions exoplasticques des cellules folliculeuses de l'ovaire chez la lapin. Verh. Anat. Ges. Berlin 1908, S. 152—156.

Retzius, G.: Zur Kenntnis der Hüllen und besonders des Follikelepithels an den Eiern der Wirbeltiere. In: Biologische Untersuchungen, S. 45—50. Jena: Gustav Fischer 1912.

Schrader, F., and C. Leuchtenberger: The origin of certain nutritive substances in the eggs of hemiptera. Exp. Cell. Res. **3**, 136—146 (1952).

Schwarz, W.: Electron microscopical studies of the fibrillogenesis in the human cornea. IV. Internat. Kongr. der Anatomen in New York 1960 (im Druck).

— Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Aufbau und die Bildung der Sehne. Orthopäd. Kongr. Berlin Okt. 1960 (im Druck).

Sheldon, H.: Observations on the production of matrix by bone and cartilage cells. Europ. Elektronenmikroskopischer Kongr. Delft 1960 (im Druck).

Siekevitz, P.: On the meaning of intracellular structure for metabolic regulation. Ciba Foundation Symp. on Cell Metabolism 1959, p. 17—45.

Sotelo, I. R., and K. R. Porter: An electron microscope study of the rat ovum. J. biophys. biochem. Cytol. **5**, 327—342 (1959).

Stegner, H.-E., u. H. Wartenberg: Elektronenmikroskopische und histotopochemische Untersuchungen über Struktur und Bildung der Zona pellucida menschlicher Eizellen. Z. Zellforsch. **53**, 702—712 (1961).

Strassmann, E.: Eizelle und Follikel bei vitaler Färbung. Z. Geburtsh. Gynäk. **105**, 33—42 (1933).

Stricht, O. van der: Etude comparée des ovules des mammifères aux différentes périodes de l'ovogénèse. Arch. Biol. (Liège) **33**, 229—300 (1923).

Trujillo-Cenoz, O., and J. R. Sotelo: Relationship of the ovular surface with follicle cells and the origin of the zona pellucida in rabbit oocytes. J. biophys. biochem. Cytol. **5**, 347—350 (1959).

Waldeyer, W.: Die Geschlechtszellen. In O. Hertwigs Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere, Bd. 1. Jena: Gustav Fischer 1906.

Wartenberg, H., u. H. E. Stegner: Die Feinstruktur des menschlichen Ovarialeies. I. Europ. Anatomenkongr. in Straßburg, Aug. 1960.

Watson, M. L.: Reduction of heating artefacts in thin sections examined in the electron microscope. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 1017—1023 (1957).

Watzka, M.: In Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Harn- und Geschlechtsapparat. Ergänzung zu Bd. VII/1, Teil 3: Weibliche Genitalorgane, Das Ovarium. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1957.

Yamada, E. T. M., A. Motomura and K. Koga: The fine structure of the oocyte in the mouse ovary studied with the electron microscope. Kurume med. J. **4**, 148—171 (1957).

Dr. H.-J. Merker,
Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin,
Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 15

Aufnahmebedingungen

I. Sachliche Anforderungen

1. Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören.

2. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigungen bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Dasselbe gilt von Versuchen und Beobachtungen, die ein positives Resultat nicht ergeben haben. Arbeiten, rein referierenden Inhalts werden abgelehnt, vorläufige Mitteilungen nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellung der Tatbestände ist zulässig. Aufsätze spekulativen Inhalts sind nur dann geeignet, wenn sie durch neue Gesichtspunkte die Forschung anregen.

II. Formelle Anforderungen

1. Das Manuskript muß leicht leserlich (möglichst in Maschinenschrift) geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern beizufügen. Diktierte Arbeiten bedürfen der stilistischen Durcharbeitung zwecks Vermeidung von weitschweifiger und unsorgfältiger Darstellung. Absätze sind nur zulässig, wenn mit ihnen ein neuer Gedankengang beginnt.

2. Die Arbeiten müssen *kurz* und stilistisch einwandfrei geschrieben sein. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen (in Monographien, „Ergebnissen", Handbüchern) herzustellen.

3. Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.

4. Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenfassung (höchstens 1 Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen, die in einer der Kongreßsprachen abgefaßt sein kann.

5. Von jeder Versuchsart bzw. jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text oder, wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. Es wird empfohlen, durch eine Fußnote daraufhinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen oder angefordert werden kann.

6. Die *Abbildungen* sind auf das unbedingt Notwendige zu beschränken. Kurven, Diagramme usw., die nur zur Illustration von Befunden dienen und ohne weiteres im Text beschrieben werden können, werden zurückgewiesen. Knappe, klare Abbildungsunterschriften (Legenden) erübrigen nochmalige Beschreibung im Text. Sie sind getrennt von den Abbildungen dem Manuskript im Anschluß an das Literaturverzeichnis beizufügen. Unzulässig ist die *doppelte* Darstellung in Abbildung *und* Kurve. Bereits veröffentlichte Abbildungen können nicht wiederholt werden. Ausnahmen hiervon sind nur in besonders begründeten Fällen möglich. *Farbige* Bilder können in der Regel keine Aufnahme finden. Für Kurven oder Schwarzweißzeichnungen, die als Strichätzung reproduziert werden können, genügt die Ablieferung sauberer, klarer Skizzen, die vom Verlag umgezeichnet werden. Bei Halbtonbildern (Photos, Mikrophotos, Halbtonzeichnungen) sind saubere, scharfe und tonwertreiche Originalvorlagen (Hochglanzabzüge von Originalphotographien) notwendig. Besondere Wünsche des Autors hinsichtlich des linearen Verkleinerungs- und Vergrößerungsmaßstabes der Vorlagen sollen vermerkt werden.

Die *Beschriftung* der Abbildungen mit Buchstaben oder Ziffern erfolgt durch den Verlag. Die Hinweise hierfür sollen keinesfalls in der Abbildung selbst, sondern auf einem darüberliegenden transparenten Deckblatt angegeben werden. Dort sind auch Abstriche oder gewünschte Bildausschnitte zu bezeichnen. Hinweispfeile oder -linien sind ebenfalls auf dem Deckblatt anzubringen, wobei die Endpunkte durch Einstich mit einer feinen Nadel auf der darunterliegenden Originalvorlage fixiert werden sollen. Es empfiehlt sich ferner, auf dem Deckblatt wichtige Abbildungspartien zu kennzeichnen, damit die Kunstanstalt bei der Ätzung ihr besonderes Augenmerk darauf richten kann.

7. Literaturangaben sollen Autorennamen, vollständigen Titel der Arbeit, Zeitschrift, Band- und Seitenzahl sowie Jahreszahl umfassen [z.B. Böke, W.: Untersuchungen des Linsenepithels mit dem Phasenkontrastmikroskop. Z. Zellforsch. *38*, 428—454 (1953)]. Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen alphabetisch anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der betreffenden Stelle im Text eine in Klammern gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literaturverzeichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem Titel, Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.

8. Methodik, Protokolle und weniger wichtige Teile des Textes sind für *Kleindruck* vorzumerken. Die Lesbarkeit des Wesentlichen wird hierdurch gehoben.

9. Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel einer Arbeit nicht die gleichen sind.

10. An *Dissertationen*, soweit deren Aufnahme überhaupt zulässig erscheint, werden nach Form und Inhalt dieselben Anforderungen gestellt wie an andere Arbeiten. Danksagungen an Institutsleiter, Dozenten usw. werden nicht abgedruckt. Zulässig sind einzeilige Fußnoten mit der Mitteilung, wer die Arbeit angeregt und geleitet oder wer die Mittel dazu gegeben hat. *Festschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.

Symposion über Krebsprobleme

Arbeitstagung des Beratungsausschusses für Krebsforschung beim Kultusministerium des Landes Nordrhein-Westfalen am 27. und 28. Juni 1960 in Düsseldorf

Zusammengestellt von K. G. Ober, Köln · H. M. Rauen, Münster/W. J. Schoenmackers, Aachen · J. Zander, Köln

Mit 91 Abbildungen. IV, 176 Seiten Gr.-8°. 1961. DM 42,—

INHALTSÜBERSICHT

Das beginnende Carcinom der Cervix. Von K. G. Ober, Köln · Beitrag zur submikroskopischen Morphologie menschlicher Tumoren. Von H. Schulz, Düsseldorf · Der submikroskopische Bau des Bronchial- und des Darmcarcinoides. Von E. Langer, Düsseldorf · Biochemische Untersuchungen bei hormonempfindlichen Geschwülsten. Von H. Breuer, Bonn · Die Harngonadotropine bei weiblichen Genital-Carcinomen und ihre Beeinflussung durch Verabfolgung von Keimdrüsenhormonen. Von R. Buchholz, Düsseldorf · In vitro-Studien an Ovarien mit abnormer Hormonbildung. Von J. Zander, Köln · Beeinflussung der sublichtmikroskopischen Struktur von Tumorzellen durch Cytostatika. Von H. Themann und C. G. Schmidt, Münster/W. · Energiestoffwechsel von Tumorzellen im Hinblick auf die Einwirkung von Cytostatika. Von C. G. Schmidt, Münster/W. · Über die Grundlagen einer Chemotherapie maligner Tumoren. Von W. Schulemann, Bonn · Zur Behandlung transplantabler Tumoren mit cytotoxischen Verbindungen. Von H. Osswald, Bonn · Verwendung von Mikroorganismen zu Untersuchungen über die Wirkungsmechanismen von Carcinostatika. Von H. M. Rauen, Münster/W. · Die Wirkungsweise von Actinomycinen bei Neurospora crassa und Streptococcus faecalis. Von H. Kersten, Münster/W. · Reaktion von Actinomycin mit DNS und RNS. Von W. Kersten, Münster/W. · Methodische Probleme der therapeutischen Krebsforschung. Von G. Oberhoffer, Bonn · Klinische Probleme der cytostatischen Krebstherapie. Von J. Lange und F. Bange, Bonn · Diskussionen zu den einzelnen Referaten · Sachverzeichnis.

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg. — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg
Printed in Germany